



Fabília Ferreira Suaid

CIRURGIÃ-DENTISTA

“AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA DO EFEITO DO TRANSPLANTE AUTÓGENO DE  
CÉLULAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL NO TRATAMENTO DE DEFEITOS  
DE FURCA GRAU III EM CÃES.”.

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de  
Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para  
obtenção do título de Doutora em Clínica Odontológica na  
Área de Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Enilson Antônio Sallum

Co-Orientadora: Profa. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz

Piracicaba

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8<sup>a</sup>. / 6159

Su12a

Suaid, Fabrícia Ferreira.

Avaliação histométrica do efeito do transplante autólogo de células do ligamento periodontal no tratamento de defeitos de furca grau III em cães / Fabrícia Ferreira Suaid. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Enilson Antônio Sallum.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Engenharia tecidual. 2. Doença periodontal. I. Sallum, Enilson Antônio. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Autologous periodontal ligament cells in the treatment of class III furcation defects. A histometric study in beagle dogs

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Tissue engineering. 2. Periodontal disease

Área de Concentração: Periodontia

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca Examinadora: Enilson Antônio Sallum, Giuseppe Alexandre Romito, Joni Augusto Cirelli, Francisco Humberto Nociti Júnior, Márcio Zaffalon Casati

Data da Defesa: 28-04-2010

Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 28 de Abril de 2010, considerou a candidata FABRICIA FERREIRA SUAID aprovada.



Prof. Dr. ENILSON ANTONIO SALLUM




Prof. Dr. GIUSEPPE ALEXANDRE ROMITO



Prof. Dr. JONI AUGUSTO CIRELLI



Prof. Dr. FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JÚNIOR



Prof. Dr. MÁRCIO ZAFFALON CASATI

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, com muito carinho...

Aos meus pais, Dalila e Elias, que abraçaram os meus sonhos e nunca mediram esforços para me ajudar a realizá-los.

À minha irmã Fernanda, por tornar mais leve meus problemas e por ajudar a solucioná-los.

À minha querida avó Dulce, pelo amor incondicional.

Ao Alan, que esteve ao meu lado desde o princípio desta caminhada.  
Obrigada pelo companheirismo e incentivo em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre guiou meus passos, iluminando o meu caminho e me consolando nos momentos difíceis. Agradeço-Lhe por me acolher como filha amada e por me dar força, coragem, sabedoria e serenidade, para seguir em frente, segundo Sua vontade.

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas.

Ao Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, Digníssimo Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

À Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Garcia Rodrigues, coordenadora do curso de Clínica Odontológica e ao Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior, coordenador dos cursos de Pós-graduação.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, pela estrutura oferecida para esta etapa da minha formação profissional e aos seus funcionários que, com dedicação e profissionalismo, trabalham para manter tudo em ordem.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo auxílio financeiro indispensável ao desenvolvimento desta pesquisa através do processo 06/58882-5 e à CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro ao desenvolvimento de todas as atividades durante meu curso de doutorado através do processo 118176/2007-2.

Ao meu professor orientador, Enilson Antônio Sallum, pelo exemplo de profissionalismo e seriedade. Obrigada pela confiança no desenvolvimento dos projetos a mim confiados.

A minha co-orientadora Karina Gonzales Silvério Ruiz, pela disponibilidade e atenção com que sempre me acolheu. Obrigada por fazer desta pesquisa um projeto “nosso”. Suas opiniões e sugestões foram fundamentais. Espero que nossa amizade perdure.

Ao Prof. Antônio Wilson Sallum, pelo carinho e entusiasmo a mim dispensados. Com suas palavras de estímulo, muitos obstáculos puderam ser facilmente transpostos. Por estar sempre imbuindo em seus alunos a determinação pela busca incessante do conhecimento.

Ao Prof. Márcio Zaffalon Casati, pelo exemplo de profissionalismo jovem, determinação e competência.

Ao Prof. Francisco Humberto Nociti Junior, o nosso convívio me faz aprender cada vez mais. Obrigada pelos conselhos e pelo apoio durante toda a elaboração desta pesquisa. Suas opiniões e sugestões foram fundamentais.

Ao Prof. Sérgio de Toledo, convivemos pouco, mas o suficiente para admirá-lo. Muito obrigada pelo exemplo que nos dá.

À Profa. Gláucia Maria Bovi Ambrosano, que tão pacientemente me ajudou na estatística desta dissertação e de vários outros trabalhos. Obrigada pelo seu exemplo de serenidade e competência.

Ao amigo Marcelo Diniz Carvalho, por nunca ter tido receio de compartilhar e ensinar. Obrigada por ter me ajudado na realização deste trabalho.

Às amigas Denise Andia, Cláudia Batitucci, Liana Lima, Mirella Lindoso, Mônica Grazielle e Thaisângela Rodrigues, pelas conversas e pela amizade sincera.

À minha amiga Ângela Guimarães Martins, por todo apoio no início de minha caminhada em Piracicaba. Sua amizade e seus conselhos foram muito importantes para que eu chegasse até aqui.

À Eliete Aparecida F. de Lima, pelos inúmeros auxílios ao longo desses anos. À minha amiga Lia, muito obrigada pela sua amizade e pelo grande apoio em todos os momentos.

Aos amigos Liana, Ezymar, Mirela, Mônica, Thaisângela, Tatiana, Ana Paula, Hugo, Lucas e Maria Fernanda. Obrigada pelo carinho e respeito. Vocês foram importantes para que os dias fossem menos cansativos. Torço por todos vocês.

A minha companheira de trabalho, Fernanda Ribeiro, muito obrigada pela disponibilidade e esforço em fazer com que tudo acontecesse da melhor maneira possível durante todos os experimentos.

A amiga Thaisângela Rodrigues, muito obrigada pela ajuda fundamental para a realização deste trabalho.

Às “meninas” do laboratório de Histologia – Ivani, Cidinha e Eliene – pela ajuda indispensável na execução de parte do processamento histológico deste trabalho e pelos momentos agradáveis de convivência no laboratório.

Aos bioteristas Wanderley e Fábio, pelo indispensável cuidado e responsabilidade com os meus cães.

À banca de Qualificação, professoras Cristiane Ribeiro Salmon, Diane Cristina Peruzzo e Karina Gonzales Silvério Ruiz, pelas valiosas sugestões neste trabalho.

À minha tia Cleuza (*i.m.*) por todo incentivo, apoio e atenção a mim dedicados. Sua ausência física é sentida com frequência e seus conselhos são lembrados diariamente.

A todos que indiretamente tiveram grande importância para a realização de mais essa etapa da minha formação.



“O importante não é aquilo que fazem de nós, mas o que nós mesmos fazemos do que os outros fizeram de nós.”

*Jean-Paul Sartre*

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar histometricamente o efeito do transplante autólogo de células do ligamento periodontal (PDLCS), associado à regeneração tecidual guiada (RTG), no tratamento de defeitos de furca grau III criados cirurgicamente em cães. Inicialmente, as PDLCS foram obtidas das raízes do 2º pré-molar e do 1º molar inferior extraídos, bilateralmente, de sete cães da raça beagle. Em seguida, as células foram cultivadas *in vitro* e caracterizadas fenotipicamente. Lesões de furca grau III foram criadas nos 3ºs e 4ºs pré-molares inferiores e os defeitos foram aleatoriamente escolhidos para receber os seguintes tratamentos: Grupo Controle – instrumentação da superfície radicular com auxílio de curetas e posicionamento coronário dos retalhos (7); Grupo RTG – regeneração tecidual guiada (7); Grupo Esponja – RTG + esponja de colágeno (7); Grupo Células – RTG + células do ligamento periodontal embebidas na esponja de colágeno, na ausência de soro fetal bovino (7). Após três meses, os animais foram sacrificados e os blocos contendo os espécimes foram processados para análise histológica. Os parâmetros histométricos avaliados foram: extensão total do defeito (ETD), extensão não preenchida do defeito (ENP), novo cemento (NC), regeneração periodontal (RP), extensão de epitélio/conjuntivo (EEC), anquilose (ANQ), área total do defeito (ATD), área não preenchida (ANP), área preenchida (AP), área de novo osso (NO), área de epitélio/tecido conjuntivo (AEC). Resultados: A caracterização fenotípica, *in vitro*, demonstrou que as PDLCS foram capazes de promover a formação de nódulos minerais, bem como de expressar sialoproteína óssea (*BSP*), colágeno do tipo I (*COL I*) e a fosfatase alcalina (*ALP*). Histometricamente, a análise de dados demonstrou que o grupo tratado com células apresentou uma maior extensão de novo cemento ( $1,70 \pm 0,60$  mm;  $2,87 \pm 0,74$  mm;  $3,66 \pm 0,95$  mm e  $4,82 \pm 0,61$  mm, para os grupos controle, RTG, esponja e células, respectivamente;  $p < 0,001$ ), uma maior extensão da regeneração periodontal ( $0,69 \pm 0,59$  mm;  $1,52 \pm 0,39$  mm;  $2,33 \pm 0,95$  mm e  $3,43$

$\pm 1,44$  mm, para os grupos controle, RTG, esponja e células, respectivamente;  $p = 0,001$ ) e uma maior área de novo osso ( $1,89 \pm 0,95$  mm<sup>2</sup>;  $2,91 \pm 0,56$  mm<sup>2</sup>;  $3,94 \pm 1,52$  mm<sup>2</sup> e  $5,45 \pm 1,58$  mm<sup>2</sup>, para os grupos controle, RTG, esponja e células, respectivamente;  $p = 0,0012$ ). Dentro dos limites deste estudo, concluiu-se que o transplante autógeno de PDLCs associadas à RTG favoreceu a regeneração periodontal em defeitos de furca grau III.

**PALAVRAS CHAVES:** engenharia tecidual, doença periodontal/cirurgia, regeneração periodontal, defeito de furca.

## ABSTRACT

The aim of this study was to histometrically investigate the potential use of autogenous periodontal ligament cells (PDLCs) associated with guided tissue regeneration (GTR) for tissue engineering in surgically created class III furcation defects in dogs. PDLCs were obtained from the tooth root of bilateral mandibular 2<sup>nd</sup> premolar (P<sub>2</sub>) and the 1<sup>st</sup> molar (M<sub>1</sub>) extracted from seven beagle dogs, cultured *in vitro* and phenotypically characterized with regard to their biological properties. Bilateral class III furcation lesions were surgically created at 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> premolars (P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub>) and the defects were randomly assigned to one of the following groups: Control Group: root surface was scaled and planned with curettes and the flap was coronally positioned (n=7), GTR Group: two bioabsorbable membranes were adapted to cover the buccal and lingual aspects of the defect (n=7), Sponge Group: the collagen sponge scaffold was placed in the furcation area associated with GTR (n=7), Cell Group: the collagen sponge scaffold, with the cell suspension without FBS was placed in the furcation area associated with GTR (n=7). After 3 months, the animals were sacrificed and the blocks containing the experimental specimens were processed for histological analysis. The histometric parameters evaluated were: total defect length (TDL), tissue-free defect length (TFL), new cementum (NC), periodontal regeneration (R), epithelium/connective tissue extension (ECT), Ankylosis (ANQ), total defect area (TDA), non-filled area (NFA), soft tissue area (STA) and new bone area (NBA). Results: *In vitro*, phenotypic characterization demonstrated that PDLCs were able to promote mineral nodule formation as well as to express bone sialoprotein (BSP), type I collagen (COL I) and alkaline phosphatase (ALP). Histometrically, data analysis demonstrated that the cell-treated group presented a superior length of new cementum ( $1.70 \pm 0.60$  mm;  $2.87 \pm 0.74$  mm;  $3.66 \pm 0.95$  mm and  $4.82 \pm 0.61$  mm, for control, GTR, sponge and cell groups, respectively;  $p < 0.001$ ), a greater extension of periodontal regeneration ( $0.69 \pm 0.59$  mm;  $1.52 \pm 0.39$  mm;  $2.33 \pm 0.95$  mm and  $3.43 \pm 1.44$

mm, for control, GTR, sponge and cell groups, respectively;  $p=0.001$ ) and a larger area of new bone ( $1.89 \pm 0,95 \text{ mm}^2$ ;  $2.91 \pm 0,56 \text{ mm}^2$ ;  $3.94 \pm 1,52 \text{ mm}^2$  and  $5.45 \pm 1,58 \text{ mm}^2$ , for control, GTR, sponge and cell groups, respectively;  $p=0,0012$ ). Within the limits of this animal study, it was concluded that PDLCs in association with GTR may be a useful option to promote periodontal tissue regeneration in class III furcation defects.

Key words: tissue engineering; periodontal disease/surgery; periodontal regeneration; furcation defects

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1. Cicatrização da ferida periodontal	04
2.2. Capacidade regeneradora das células envolvidas na cicatrização periodontal	05
2.3. Propriedades cementoblástica/osteoblásticas das células do ligamento periodontal	08
2.4. Aplicação da engenharia tecidual na regeneração de defeitos periodontais fundamentado na capacidade regeneradora das células do ligamento periodontal	12
3. PROPOSIÇÃO	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1. Seleção dos Animais	19
4.2. Delineamento do Estudo	19
4.3. Procedimentos Cirúrgicos	20
4.4. Caracterização do fenótipo das células do ligamento periodontal dos cães	24
4.4.1. Ensaio de Mineralização	24
4.4.2. Análise da Expressão Gênica	25
4.5. Identificação das células no interior das esponjas de colágeno por meio de microscopia eletrônica de varredura	28
4.6. Confeção e tratamento dos defeitos	28
4.7. Processamento histológico	31
4.8. Análise histométrica	32
4.9. Análise estatística	35

5. RESULTADOS	36
5.1. Caracterização fenotípica das células do ligamento periodontal	36
5.2. Identificação das células no interior das esponjas de colágeno (MEV)	37
5.3. Observações Clínicas	38
5.4. Análise Histológica	39
5.5. Análise Histométrica	42
6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÃO	51
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	52
9. ANEXO	60

## 1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal inflamatória caracteriza-se pela destruição dos tecidos que suportam os dentes, os quais incluem ligamento periodontal, cimento e osso alveolar, constituindo-se na principal causa da perda dental com implicações significativas ao nível de saúde pública (Egelberg *et al.*, 1987; Han *et al.*, 2003). Embora a descontaminação da superfície radicular (cirúrgica ou não) promova bons resultados quanto à redução da profundidade de sondagem e a estabilização do nível clínico de inserção, histologicamente, o tecido epitelial prolifera de forma mais rápida do que os tecidos mesenquimais envolvidos (ligamento periodontal, cimento dental e osso alveolar) o que resulta em um padrão de cura do tipo reparação (epitélio juncional longo) e não regeneração (Listgarten & Rosemberg, 1979). Desta maneira, um dos principais objetivos da terapia periodontal tem sido a tentativa de regenerar os tecidos periodontais perdidos em decorrência do processo inflamatório (Carranza, 1996; Karring *et al.*, 1997; Sculean *et al.*, 2002) .

Atualmente, com os avanços no conhecimento a respeito dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo de formação e regeneração dos tecidos periodontais, considera-se que o sucesso da regeneração depende da migração e proliferação das células do ligamento periodontal remanescente, as quais deverão repovoar a superfície radicular, diferenciando-se em osteoblastos, cementoblastos e fibroblastos, e sintetizando os componentes das matrizes teciduais (Gotllow *et al.*, 1984).

Baseado neste princípio biológico, a terapia denominada regeneração tecidual guiada (RTG) visa excluir as células epiteliais e do tecido conjuntivo da área da ferida, permitindo assim, que as células do ligamento periodontal remanescente proliferem (Cortellini & Tonetti, 2000; Gonçalves *et al.*, 2006). Essa terapia vem sendo aplicada isoladamente ou associada ao uso de enxertos ósseos de diversas origens (Rosen *et al.*, 2000) e/ou a moléculas bioativas (Camargo *et al.*, 2002; Sallum *et al.*, 2004). Entretanto, as evidências clínicas e os



experimentos em animais mostram a dificuldade destas terapias em obter a completa regeneração dos tecidos periodontais (Park *et al.*, 1995; Sander & Karring, 1995; Venezia *et al.*, 2004). Provavelmente, um dos motivos que contribui para as limitações e a baixa previsibilidade das terapias regenerativas, é o fato destes tratamentos dependerem de uma quantidade adequada de células remanescentes do ligamento periodontal (Gottlow *et al.*, 1986).

Visando uma maior previsibilidade de sucesso dos tratamentos regenerativos o estudo da engenharia tecidual tem sugerido a possibilidade do uso da terapia celular como alternativa para as técnicas até então utilizadas (Nakahara *et al.*, 2004; Akizuki *et al.*, 2005, Murano *et al.*, 2006). A engenharia tecidual, uma área contemporânea da biomédica, apresenta como enfoque o desenvolvimento de procedimentos e biomateriais visando a reconstrução de tecidos perdidos decorrentes de traumas, cirurgias ressectivas ou processos patológicos, baseado nos princípios da biologia celular.

Uma possível abordagem da engenharia tecidual na periodontia visa a modulação da resposta cicatricial através da implantação de células, cultivadas *in vitro*, em defeitos periodontais. Assim, diferindo da RTG que através do uso de membranas acelulares, tem como objetivo criar um espaço sob o qual as células do próprio hospedeiro se proliferarão, na terapia celular não há a necessidade de um número adequado de células remanescentes do ligamento periodontal. Desta maneira, estudos recentes têm proposto a utilização de transplante autólogo de células do ligamento periodontal, associadas ou não à RTG, na tentativa de se criar uma fonte apropriada de células (Nakahara *et al.*, 2004; Akizuki *et al.*, 2005, Murano *et al.*, 2006). Observa-se, no entanto, que as informações disponíveis na literatura até o momento não são muito esclarecedoras em relação à caracterização das células implantadas nos defeitos periodontais e aos resultados obtidos após a terapia celular. Sendo assim, este trabalho tem por objetivo avaliar histometricamente o efeito do transplante autólogo de células do ligamento

periodontal, associado à RTG, no tratamento de defeitos de furca grau III criados cirurgicamente em cães.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 – CICATRIZAÇÃO DA FERIDA PERIODONTAL

O objetivo do tratamento periodontal consiste, principalmente, na resolução do processo inflamatório por meio da eliminação dos depósitos e toxinas bacterianas da superfície dental, mas também se fundamenta na manutenção e longevidade funcional e estética de dentes saudáveis (Cortellini *et al.*, 1990). Procedimentos convencionais como raspagem e alisamento radicular, gengivectomia, cirurgias a retalhos e cirurgia óssea agem de maneira positiva nos defeitos anatômicos produzidos pela doença periodontal, reduzindo a profundidade de sondagem tanto à custa da promoção de um ganho de inserção clínico como também devido à retração dos tecidos gengivais (Badersten *et al.*, 1985; Renvert *et al.*, 1985). Durante vários anos, essas mudanças favoráveis foram interpretadas como verdadeira regeneração periodontal (Rosling *et al.*, 1976). Entretanto, Caton *et al.* (1980), utilizando o modelo experimental em primatas, observaram que os procedimentos convencionais resultavam na formação de um epitélio juncional longo, sem a formação de nova inserção conjuntiva, mostrando a capacidade do epitélio em ocupar rapidamente a área da ferida, impedindo a regeneração periodontal.

Nas últimas décadas, com o surgimento dos procedimentos regenerativos que aumentaram o número de opções para o tratamento de defeitos periodontais, o termo “regeneração” vem sendo discutido e, segundo a Academia Americana de Periodontia (1992), pode ser definido como: processo de cura que reproduz ou reconstitui a arquitetura e função do tecido ferido ou perdido por ocorrência da doença. Seguindo esta definição, a regeneração periodontal é a reconstituição do periodonto de inserção através da formação de novo ligamento, novo cemento e novo osso ao redor dos dentes que perderam estas estruturas após a instalação e progressão da doença periodontal (Lynch, 1992). Desta forma, a cura da ferida com formação de epitélio juncional longo, anquilose ou

reabsorção radicular é um processo definido como reparo, já que não restaura completamente a arquitetura e função das estruturas perdidas (Caton & Greenstein, 1993).

Segundo Lindhe *et al.* (1982), a cicatrização através da formação do epitélio juncional longo não compromete a estabilidade dos resultados obtidos com a terapia cirúrgica. Entretanto, em longo prazo, a presença de uma barreira epitelial tem sido vista como uma seqüela indesejável resultante dos eventos de cura periodontal, na medida em que parece impedir a formação de um novo aparato de inserção sobre a superfície radicular, além de não representar regeneração periodontal verdadeira (Cortellini *et al.*, 1993). Sendo assim, o reparo da ferida periodontal deve ser evitado, sempre que possível, e a formação de novo cemento com fibras inseridas acompanhado de novo osso ao redor dos dentes permanece como objetivo final, embora nem sempre alcançado, da terapia periodontal regeneradora. Visando aumentar a previsibilidade de uma total reconstituição dos tecidos periodontais destruídos pela doença, o potencial regenerativo inato do periodonto tem sido extensamente investigado (Melcher, 1976; Karring *et al.*, 1980; Nyman *et al.*, 1980; Buser *et al.*, 1990; Warrer *et al.*, 1993).

## 2.2 – CAPACIDADE REGENERADORA DAS CÉLULAS ENVOLVIDAS NA CICATRIZAÇÃO PERIODONTAL

Na década de 70 foi sugerido que a natureza da nova inserção formada após uma cirurgia periodontal seria determinada pelo tipo de célula que repovoasse a superfície radicular durante a cicatrização (Melcher, 1976). Nesse estudo de revisão, os conceitos biológicos básicos para a regeneração periodontal foram postulados e as estruturas periodontais foram subdivididas em quatro diferentes fontes de células para a cicatrização da ferida periodontal: células epiteliais, células derivadas do tecido conjuntivo gengival, células derivadas do osso e células derivadas do ligamento periodontal. A natureza da inserção

formada após o tratamento periodontal seria determinada pelos tipos de células que repovoassem a superfície radicular.

Complementando esse pensamento, uma série de estudos foi realizada com o objetivo de se determinar a capacidade regeneradora desses diferentes tipos celulares. Karring *et al.* (1980) avaliaram o potencial de células provenientes do tecido ósseo em produzir uma nova inserção conjuntiva. Em um modelo em cães, os autores induziram a doença periodontal em pré-molares inferiores que foram extraídos, posteriormente, para instrumentação da porção radicular afetada pela doença. Após a raspagem, as raízes foram reimplantadas em cavidades criadas no osso alveolar e sepultadas por três meses. A avaliação histológica mostrou que, enquanto o reparo do tecido conjuntivo não ocorreu nas porções radiculares instrumentadas, sendo observado freqüentemente anquilose e reabsorção radicular, na porção apical da raiz onde o ligamento periodontal foi preservado observou-se uma inserção com fibras periodontais funcionalmente orientadas. Com base nesses achados, concluiu-se que as células derivadas do tecido ósseo não apresentavam a capacidade de regenerar o ligamento periodontal.

Seguindo uma metodologia semelhante, Nyman *et al.* (1980) realizaram um estudo no qual os dentes receberam o mesmo tratamento descrito no estudo anterior, porém não foram transplantados em alvéolos, mas colocados em cavidades ósseas preparadas na parte vestibular da mandíbula. Assim, parte da superfície radicular ficou em contato com tecido ósseo enquanto a superfície restante estava em contato com o tecido conjuntivo do retalho. Similarmente ao estudo prévio, áreas com ligamento periodontal foram observadas na porção apical das raízes. A porção cervical radicular em contato com o retalho apresentou um tecido conjuntivo com fibras orientadas paralelamente à superfície radicular sem inserção à raiz. Os autores concluíram que o tecido conjuntivo gengival também não possuía células com potencial de regenerar o periodonto e que as células progenitoras para a formação de nova inserção conjuntiva residiam no

próprio ligamento periodontal. Conseqüentemente, esperava-se que uma nova inserção conjuntiva fosse previsível se essas células repovoassem a superfície radicular.

Essa teoria foi reafirmada posteriormente em outros dois estudos em cães (Buser *et al.*, 1990; Warrer *et al.*, 1993). Nesses estudos, implantes de titânio foram colocados em contato com as porções apicais de raízes retidas nos seus alvéolos, de maneira que o ligamento periodontal pudesse servir de fonte de células para repovoar a superfície do implante. A análise microscópica revelou que uma camada distinta de cemento com fibras colágenas inseridas tinha se formado na superfície dos implantes e que essas fibras, freqüentemente orientadas perpendicular ao implante, estavam inseridas no osso alveolar. Implantes controle, posicionados em uma área distante das raízes, cicatrizaram com aspecto característico de osseointegração (Buser *et al.*, 1990; Warrer *et al.*, 1993).

Assim, uma vez demonstrado que células progenitoras para a formação de nova inserção conjuntiva residiam no ligamento periodontal (Karring *et al.*, 1980; Nyman *et al.*, 1980; Buser *et al.*, 1990; Warrer *et al.*, 1993), esperava-se que uma regeneração periodontal verdadeira fosse previsível se essas células repovoassem a superfície radicular durante a cicatrização. Esse enfoque foi confirmado em um estudo em macacos no qual defeitos de fenestração foram criados em incisivos laterais superiores e nos caninos inferiores (Nyman *et al.*, 1982). O contato direto do tecido conjuntivo com a superfície radicular foi impedido por meio do uso de uma membrana garantindo que a área da ferida periodontal fosse repovoada por células do ligamento periodontal. Um novo cemento com fibras periodontais inseridas perpendicularmente foi observado após um período de seis meses de cicatrização. Usando o mesmo princípio esse grupo de pesquisadores forneceu posteriormente a primeira evidência clínica de que a regeneração periodontal poderia ser obtida em um dente humano afetado pela doença periodontal (Nyman *et al.*, 1982) surgindo assim a regeneração tecidual guiada.

## 2.3 – PROPRIEDADES CEMENTOBLÁSTICAS/OSTEOBLÁSTICAS DAS CÉLULAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL

O sucesso da regeneração dos tecidos periodontais depende da migração e proliferação dos diferentes tipos celulares presentes no ligamento periodontal, seguido de sua subsequente diferenciação em osteoblastos, cementoblastos e fibroblastos, culminando com a síntese de novo osso e novo cimento com fibras colágenas inseridas, ou seja, resultando na formação tanto de tecido mineralizado como de tecido não mineralizado. Isto se torna possível uma vez que o ligamento periodontal apresenta uma população heterogênea de células, devido a sua origem embrionária no folículo dental, e que essas células se encontram em diferentes estágios de diferenciação (Shimono *et al.*, 2003). Diversos estudos têm sido realizados com o intuito de estabelecer quais fenótipos celulares são realmente efetivos na regeneração dos tecidos periodontais (Macneil *et al.*, 1995; Lekic *et al.*, 1996; Macneil & Somerman, 1999), e para tanto, a avaliação da expressão de genes e proteínas específicas para tecidos mineralizados tem sido um valioso marcador utilizado para demonstrar o fenótipo cementoblástico/osteoblástico *in vitro* das células do ligamento periodontal (Somerman *et al.*, 1988; Ramakrishnan *et al.*, 1995; Ivanovski *et al.*, 2001).

No final da década de 80, estudos de caracterização “*in vitro*” (Somerman *et al.*, 1988; Piche *et al.*, 1989; Arceo *et al.*, 1991) mostraram que células derivadas do ligamento periodontal são capazes de sintetizar e expressar a enzima fosfatase alcalina, uma glicoproteína específica encontrada na superfície dos osteoblastos que é liberada durante a osteogênese. Sua função ainda não está de todo elucidada, porém seu papel na mineralização do esqueleto está confirmado, o que a faz ser considerada um marcador do metabolismo ósseo.

Somerman *et al.* (1988) compararam as células do ligamento periodontal (PDLCs) com células gengivais, ambas provenientes do mesmo paciente. As PDLCs foram obtidas do ligamento periodontal de pré-molares extraídos por indicação ortodôntica enquanto que as células gengivais foram obtidas por meio de biópsia realizada na região vizinha à extração. Os autores observaram que a

síntese de proteína total, bem como a síntese de colágeno, eram maiores nas PDLCs quando comparado às células gengivais. A atividade de fosfatase alcalina também era superior nas culturas de PDLCs o que, segundo os autores, sugeria um perfil osteoblástico destas células.

Já Piche *et al.* (1989) realizaram um estudo no qual as PDLCs, assim como as células gengivais e as células ósseas, foram obtidas após a extração de terceiros molares impactados. Como critério para avaliação do fenótipo cementoblástico/osteoblástico os autores avaliaram: o aumento da produção do AMPc (adesino monofosfato cíclico) em resposta ao paratormônio (fator ósseo/cimento indutivo), a atividade da fosfatase alcalina e o aumento da atividade da fosfatase alcalina em resposta ao paratormônio. Os autores observaram que tanto as PDLCs como as células derivadas do tecido ósseo apresentaram um aumento do AMPc em resposta ao paratormônio assim como da atividade da fosfatase alcalina. Segundo os autores, esses achados estavam de acordo com estudos prévios de caracterização de células derivadas de tecidos mineralizados (Robey & Termine, 1985).

Ainda objetivando caracterizar as PDLCs, Arceo *et al.* (1991) compararam estas células com células gengivais, ambas obtidas de pré-molares extraídos de cinco pacientes periodontalmente saudáveis, por indicação ortodôntica. Os autores observaram que, para o mesmo paciente, as PDLCs apresentaram maior atividade de fosfatase alcalina quando comparada a células gengivais na mesma passagem. Quando, no mesmo estudo, os autores avaliaram a habilidade das células em promover a formação de nódulos de mineralização *in vitro*, as células gengivais não se mostraram capazes de formá-los enquanto que as PDLCs, sob mesmas condições de cultura, apresentaram nódulos minerais associados a uma densa matriz extracelular produzidas pelas mesmas células.

A formação de nódulos minerais também foi observada por Mukai *et al.* (1993) em um estudo com PDLCs de ratos cultivadas em meio contendo 10mM de  $\beta$ -glicerolfosfato de sódio. A avaliação microscópica destes nódulos mostrou que



após dois dias em meio osteogênico, uma camada de células cuboidais semelhantes a osteoblastos podia ser vista recobrendo sua superfície, enquanto que a presença de células semelhantes a osteócitos era observada embebida na sua matriz mineralizada sete dias depois. Além disso, a avaliação em microscópio de transmissão permitiu a visualização de estruturas cristalinas filamentosas no interior de vesículas presentes na matriz extracelular formando uma estrutura semelhante à matriz óssea. Baseado nesses achados os autores concluíram que as PDLCs derivadas de incisivos de ratos podem formar, *in vitro*, um tecido semelhante ao osso sugerindo a presença de células osteoprogenitoras no ligamento periodontal.

Uma avaliação morfológicas e bioquímica desses nódulos minerais produzidos pelas PDLCs foi conduzida por Ramakrishnan *et al.* (1995). As células foram obtidas de ratos, a partir do coágulo formado nos sítios de cicatrização pós-extração dos 1<sup>os</sup> molares superiores, e após atingirem confluência, foram tratadas com 50µg/ml de ácido ascórbico, 10 mM de β-glicerolfosfato e 5µm de dexametasona por três semanas. Durante este período, a formação e o desenvolvimento dos nódulos minerais foram avaliados em quatro estágios diferentes: dia 0, dia 7, dia 14 e dia 19. No primeiro estágio as células estavam em confluência, porém não apresentavam áreas com aglomerados celulares como observado no segundo estágio. A partir do dia 14 (terceiro estágio) os nódulos já podiam ser observados com a deposição de matriz mineralizada entre os aglomerados celulares, porém a mineralização só se encontrava completa no 19<sup>o</sup> dia, último estágio observado. Durante os mesmos períodos, a síntese e a distribuição de osteopontina e sialoproteína óssea na matriz extracelular foram avaliadas através de radiomarcagem e uma indução na produção dessas proteínas não colagênicas foi observada em associação com a formação dos nódulos minerais.

A osteopontina e a sialoproteína óssea, assim como a osteocalcina, o colágeno tipo I e a fosfatase alcalina são algumas das moléculas envolvidas na

regulação da formação do cimento e do ligamento periodontal (Macneil *et al.*, 1995; Lekic *et al.*, 1996; Macneil & Somerman, 1999) e por isso sua expressão pelas PDLCs têm sido investigada.

Com o objetivo de determinar a expressão desses marcadores pelas células do ligamento periodontal, Ivanovski *et al.* (2001) compararam células gengivais com PDLCs de humanos em relação à expressão gênica de osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea e proteínas ósseas morfogenéticas 2 e 4 (BMP-2 e BMP-4). A reação em cadeia da polimerase pela técnica da transcriptase reversa (RT-PCR) revelou que as PDLCs apresentaram maior expressão de osteopontina quando comparada às células gengivais enquanto que a osteocalcina e a sialoproteína óssea foram expressas somente pelas PDLCs.

Sendo assim, estudos prévios têm mostrado que as células do ligamento periodontal possuem propriedades de células cementoblástico-osteoblástico as quais incluem: a capacidade de formar nódulos minerais *in vitro*, a expressão de genes para fosfatase alcalina, osteocalcina, osteopontina e sialoproteína óssea, além da modulação de sua resposta por fatores ósseo/cimento indutivos como o paratormônio (Piche *et al.*, 1989; Han & Amar, 2003; Bartold *et al.*, 2000).

Recentemente, Seo *et al.* (2004) demonstraram que a cultura de células obtidas a partir do ligamento periodontal de terceiros molares inclusos pode apresentar populações celulares com características de células mesenquimais indiferenciadas, as quais possuem características semelhantes às células tronco adultas tais como: alta capacidade proliferativa, auto-renovação e habilidade de se diferenciarem em tipos celulares diferentes de seu tecido de origem. Quando cultivadas *in vitro*, na presença de meios indutores específicos, essas células foram capazes de diferenciarem-se em células semelhantes a adipócitos, cementoblastos/osteoblastos e condroblastos (Pitaru *et al.*, 2002). Além disso, essas células mostraram ter um potencial regenerativo promissor, já que

promoveram a formação de uma estrutura ectópica semelhante a osso alveolar, ligamento periodontal e cimento radicular, quando transplantadas no dorso de camundongos imunossuprimidos.

#### 2.4 – APLICAÇÃO DA ENGENHARIA TECIDUAL NA REGENERAÇÃO DE DEFEITOS PERIODONTAIS FUNDAMENTADA NA CAPACIDADE REGENERADORA DAS CÉLULAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL

Uma vez determinada a capacidade regeneradora das células que residem no ligamento periodontal, o periodonto passa a ser considerado um ótimo candidato para a aplicação da engenharia tecidual, uma área contemporânea da pesquisa biomédica voltada para o desenvolvimento de procedimentos e biomateriais que visam a formação de novos tecidos. Recentes avanços em relação aos fatores de crescimento e polímeros biodegradáveis têm dado condições para que o já confirmado sucesso da engenharia tecidual, observado nos tecidos cartilaginosos e ósseos, possa ser aplicado também na regeneração dos tecidos periodontais (Bartold *et al.*, 2006).

Uma possível abordagem da engenharia tecidual no periodonto inclui o isolamento das células do ligamento periodontal seguida de sua proliferação em uma rede tridimensional *in vitro* e de sua implantação no defeito periodontal onde, moléculas sinalizadoras biológicas estimulam a formação do tecido desejado. Enquanto a regeneração tecidual guiada envolve a aplicação de uma membrana acelular como artefato para a criação e manutenção de um espaço que posteriormente será ocupado por células do próprio hospedeiro, a engenharia tecidual visa a modulação da resposta cicatricial através da implantação de células cultivadas *in vitro*. Baseado nestes princípios biológicos, vários estudos já estão sendo desenvolvidos com o objetivo de avaliar a capacidade regeneradora das células do ligamento periodontal quando implantadas nos defeitos periodontais (Van Dijk *et al.*, 1991; Dogan *et al.*, 2002; Nakahara *et al.*, 2004; Akizuki *et al.*, 2005; Hasegawa *et al.*, 2005; Murano *et al.*, 2006; Flores *et al.*, 2008; Iwata *et al.*, 2009).

O primeiro trabalho a utilizar o transplante de células na terapia regenerativa de defeitos periodontais foi descrito em 1991 por Van Dijk *et al.* (1991). Neste estudo piloto em cães, as PDLCs foram obtidas da superfície radicular de um dente previamente extraído e, após cultura em laboratório, foram aplicadas, com auxílio de uma seringa, sobre defeitos de fenestração criados na face vestibular das raízes dos 2<sup>os</sup>, 3<sup>os</sup> e 4<sup>os</sup> pré-molares inferiores. Quatro meses após o tratamento, mesmo sem a utilização de um arcabouço/ veículo para transporte das células e sem a utilização de barreiras para proteção da ferida cirúrgica, os autores observaram que os defeitos que receberam as células apresentavam a superfície radicular quase que completamente recoberta por cementoblastos enquanto que os defeitos controle apresentavam a formação de um epitélio juncional longo. Desde então, outros estudos surgiram com o objetivo de avaliar o efeito da implantação das PDLCs na regeneração dos tecidos de inserção dentária. Esses estudos variam não apenas em relação à fonte e maneira de obtenção das células (provenientes do ligamento periodontal remanescente ou coletadas de áreas em cicatrização através de biópsia), como também em relação ao tipo do material carreador utilizado, à associação ou não à regeneração tecidual guiada e ao tipo de defeito periodontal a ser regenerado.

Dogan *et al.* (2002) realizaram um estudo piloto no qual as células foram obtidas por meio de biópsia. Inicialmente os autores criaram defeitos de furca grau II nos 3<sup>os</sup> pré-molares inferiores de um cão sem raça definida e trataram por meio de RTG com a adaptação de uma membrana de politetrafluoretileno expandido (PTFE-e) por 4 semanas. Após este período, a membrana foi removida e o material formado sob a mesma foi coletado como fonte de PDLCs. Após a cultura *in vitro*, as células foram adicionadas a sangue coletado do próprio cão e centrifugadas a 700 rpm, durante 2 minutos, de maneira a formar um coágulo sanguíneo agregando-as. O coágulo foi então colocado em defeitos de furca grau II criados nos 2<sup>os</sup> e 4<sup>os</sup> pré-molares inferiores, sem a proteção de uma membrana, sendo que os defeitos contralaterais não receberam tratamento. Após um período

de cicatrização de 42 dias, os autores observaram uma maior formação de cimento nos defeitos tratados com as PDLCs.

Uma maior extensão de novo cimento também foi observada por Nakahara *et al.* (2004) após um estudo com seis cães da raça beagle. Para cada cão, as células do terço médio do ligamento periodontal dos incisivos laterais superiores e inferiores, foram removidas com o auxílio de uma cureta e cultivadas em laboratório. Defeitos de fenestração medindo 6 x 4mm foram criados nos caninos superiores bilaterais e, enquanto um defeito recebeu apenas a RTG através da colocação de uma membrana de PTFE-e, os defeitos contralaterais receberam  $3 \times 10^5$  células carregadas em uma esponja de colágeno associado à membrana. Um mês depois do tratamento os animais foram sacrificados e nos sítios que receberam as PDLCs foi observada uma maior formação de cimento ao longo de toda a extensão do defeito e não apenas concentrado no terço apical como encontrado nos defeitos do lado controle. Mínima formação óssea foi observada nos dois grupos.

Já Akizuki *et al.* (2005) encontraram resultados mais promissores em um defeito semelhante. Após obtenção da cultura primária das PDLCs curetadas do terço médio das raízes dos pré-molares inferiores, estas foram acrescentadas ao material carreador (lâmina de ácido hialurônico) e aplicadas sobre defeitos de deiscência confeccionados na raiz mesial dos 1<sup>os</sup> molares inferiores. Dois meses depois do tratamento, enquanto três dos cinco sítios que receberam as PDLCs apresentaram formação de novo osso, novo ligamento periodontal e novo cimento, apenas um defeito controle que recebeu apenas o ácido hialurônico, apresentou formação de cimento e osso.

Ainda utilizando defeitos de deiscência, porém agora confeccionados nos 1<sup>os</sup> pré-molares superiores de ratos imunossuprimidos, Hasegawa *et al.* (2005) avaliaram o potencial regenerativo das PDLCs obtidas após a extração do terceiro molar de um paciente de 20 anos de idade. As células foram cultivadas em meio contendo ácido ascórbico (50µg/ml) e transplantadas para os defeitos

mesiopalatais sem a associação com um material carreador ou uma membrana para regeneração. Quatro semanas depois do tratamento, os defeitos que receberam as células apresentavam fibras imaturas organizadas obliquamente à dentina enquanto que os defeitos controle (que não receberam tratamento) apresentavam várias áreas de anquilose.

Em outro estudo com ratos imunossuprimidos Flores *et al.* (2008) observaram que, quando as PDLcs obtidas do 2º pré-molar extraído de um paciente em tratamento ortodôntico eram cultivadas em meio osteogênico e transplantadas em defeitos de deiscência, um novo cemento com fibras inseridas podia ser observado em seis dos dez defeitos após um período de 3 semanas. Nesse mesmo estudo, após um período maior de 5 semanas, 75% da superfície radicular do grupo teste estava recoberta com cemento e uma formação óssea podia ser observada, enquanto no grupo controle apenas 25% da superfície radicular apresentava cemento.

Objetivando avaliar o potencial regenerativo dessa terapia em defeitos mais desafiadores, Murano *et al.* (2006) realizaram um estudo no qual lesões de furca grau III foram induzidas nos 2ºs e 3ºs pré-molares inferiores. Neste trabalho, os autores obtiveram as PDLcs através da técnica descrita por Sugimoto *et al.* (2004). De acordo com esta técnica, defeitos ósseos periodontais foram criados ao redor do 1º pré-molar inferior e, após a instrumentação das superfícies radiculares, foram cobertos com uma membrana de PTFE-e. Duas semanas após a criação dos defeitos, uma reentrada cirúrgica foi realizada com o objetivo de remover a membrana e obter o tecido que se desenvolveu sob a mesma. Parte deste tecido foi utilizado para a avaliação da expressão dos genes para VEGF (fator de crescimento de células endoteliais vasculares) e bFGF (fator de crescimento de fibroblastos básico) enquanto que o tecido restante foi incisado e transplantado para os defeitos de furca grau III induzidos previamente. Os autores verificaram que dentro do período de duas semanas, as células transplantadas já se mostraram capazes de promover a formação tanto de cemento com fibras de

Sharpey inseridas como de novo osso, além de estimular a expressão dos genes para VEGF e bFGF, dois fatores de crescimento associados à modulação da formação óssea, da angiogênese e da proliferação de células mesenquimais indiferenciadas.

Mais recentemente, Iwata *et al.* (2009) realizaram um estudo em cães no qual as células foram caracterizadas, *in vitro*, antes de serem transplantadas em defeitos infra-ósseos de três paredes. A caracterização foi feita através da avaliação tanto da atividade de fosfatase alcalina como da expressão gênica de alguns possíveis marcadores para células do ligamento periodontal como a sialoproteína óssea, a osteocalcina, o periostin, a microglobulina  $\beta 2$  e a proteína S100. Nesse estudo, a cultura primária das células foi obtida do ligamento periodontal removido do terço médio da superfície radicular dos pré-molares inferiores previamente extraídos. As células da terceira passagem, em uma concentração de  $3 \times 10^4$  células, foram cultivadas por cinco dias em meio de cultura suplementado com 100 $\mu$ g/mL de ácido ascórbico, 10mM de  $\beta$ -glicerolfosfato e 10nM de dexametasona. Após este período às células foi adicionada uma lâmina de ácido poliglicólico, utilizado como veículo, e essa “lâmina de células” foi recortada nas dimensões dos defeitos (5x5x4mm). Um total de três lâminas de ácido poliglicólico acrescido de células foi adaptado sobre os defeitos, criados na face mesial dos 1<sup>os</sup> molares inferiores, que também receberam como material de preenchimento partículas de  $\beta$ -fosfato tricálcio. Os defeitos contralaterais receberam apenas as lâminas de ácido poliglicólico e as partículas de  $\beta$ -fosfato tricálcio. Após um período de seis meses de cicatrização, os autores observaram que, no grupo tratado com as PDLCs, uma completa regeneração periodontal era observada em todos os defeitos infra-ósseos, embora este resultado possa em parte ser atribuído ao grande potencial regenerativo desse tipo de defeito.

A diferença dos defeitos periodontais empregados em relação ao seu potencial regenerativo (defeitos de fenestração, infra-ósseos e de furca) bem como as variações em relação à maneira de obtenção das células, ao material

carreador utilizado, assim como à associação ou não à regeneração tecidual guiada, faz com que os resultados encontrados nos diferentes estudos de engenharia tecidual não sejam tão esclarecedores. Além disso, observa-se que, até o presente momento, a caracterização das células previamente à implantação nos defeitos periodontais não é uma prática comum em todos os trabalhos. Visto isto, torna-se necessário a realização de mais estudos no sentido de se fundamentar o real potencial regenerativo desta nova terapia periodontal (transplante autógeno de células do ligamento periodontal).



### 3. PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar histometricamente o efeito do transplante autógeno de células do ligamento periodontal, associado à RTG, no tratamento de defeitos de furca grau III criados cirurgicamente em cães.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1- Seleção dos animais:

Foram utilizados sete (7) cães machos, da raça beagle, em idade adulta (12-20 meses), pesando em média 15 kg, com dentição completa e em bom estado de saúde geral.

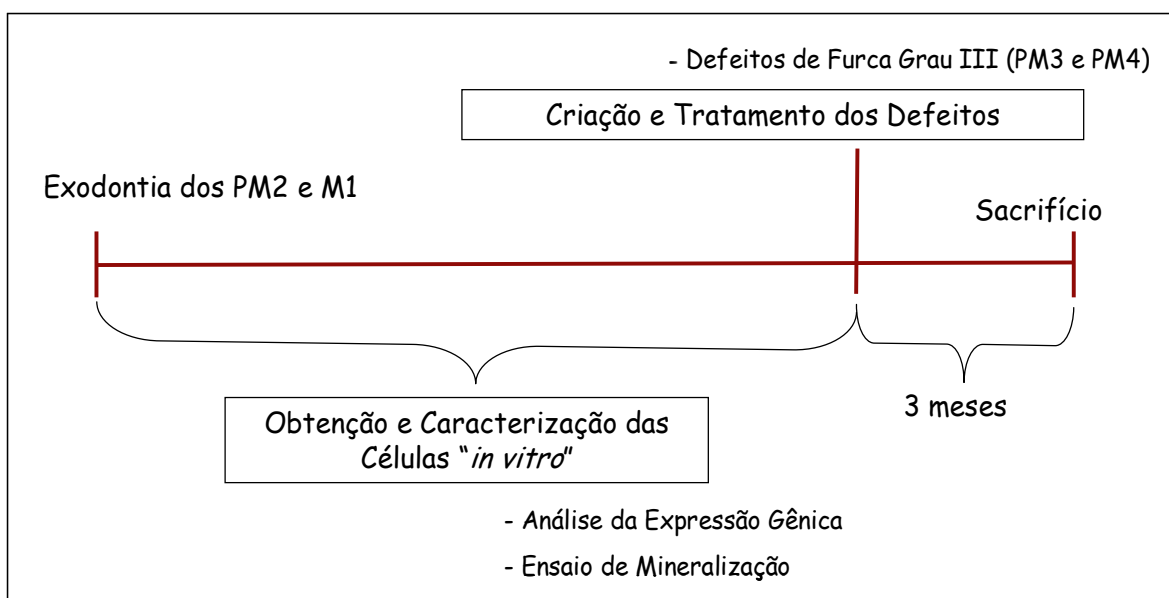
Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animal de Laboratório (SBCLA) e realizados sob aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biologia da UNICAMP - Bioterismo da UNICAMP (CEMIB) – (Protocolo nº 1082-1/ ver anexo1).

Após a chegada dos cães ao Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, os mesmos foram mantidos em baias separadas, as quais foram limpas diariamente. Os cães foram submetidos às mesmas condições ambientais e alimentares, com água *ad libitum*, além de monitorados diariamente até o final de todo o experimento.

### 4.2- Delineamento do Estudo:

Para a realização deste estudo, inicialmente foram realizadas as extrações dos segundos pré-molares e primeiros molares inferiores (PM2 e M1) de cada um dos sete cães, bilateralmente. Após o cultivo e obtenção das células do ligamento periodontal a partir dos dentes extraídos, as mesmas foram caracterizadas fenotipicamente por meio da análise da expressão gênica e da realização do ensaio de mineralização. Em seguida, os animais foram submetidos ao segundo procedimento cirúrgico para criação de defeitos de furca grau III nos terceiros e quartos pré-molares inferiores (PM3 e PM4). Neste mesmo momento, os defeitos foram aleatoriamente escolhidos para receber os seguintes tratamentos: 01- Grupo Controle: instrumentação da superfície radicular e

posicionamento coronário dos retalhos; 02- Grupo RTG: regeneração tecidual guiada (RTG); 03- Grupo Esponja: RTG + esponja de colágeno, e 04- Grupo Células: RTG + células do ligamento periodontal embebidas na esponja de colágeno. Decorridos 3 meses, os animais foram anestesiados e sacrificados para obtenção dos blocos para processamento histológico e análise dos parâmetros histométricos.



**Figura 1.** Desenho esquemático ilustrando o delineamento do estudo, apresentando os intervalos entre os procedimentos cirúrgicos e sacrifício.

#### 4.3- Procedimentos Cirúrgicos:

##### ▪ Anestesia

Duas semanas antes de cada procedimento cirúrgico (exodontia e criação/tratamento dos defeitos) os animais foram pesados e, de acordo com seu peso corpóreo foram calculadas as doses dos medicamentos utilizados no pré, trans e pós-operatório. Neste mesmo momento, os cães foram sedados com uma injeção intramuscular de 0,1mL de sulfato de atropina (Atropina 1% FAGRA<sup>®</sup>, Farmagrícola S.A., São Paulo, SP, Brasil) e 1,5mL/10 kg de cloridrato de dihidrotiazina (Rompum<sup>®</sup>, Bayer do Brasil S.A., Socorro, SP, Brasil). Com o

objetivo de preparar o tecido gengival para as cirurgias subsequentes, foi realizada a remoção de cálculo supragengival (ultrassom) e os animais passaram por um regime de aplicação tópica de digluconato de clorexidina a 0,12% durante todos os dias que precederam os procedimentos cirúrgicos.

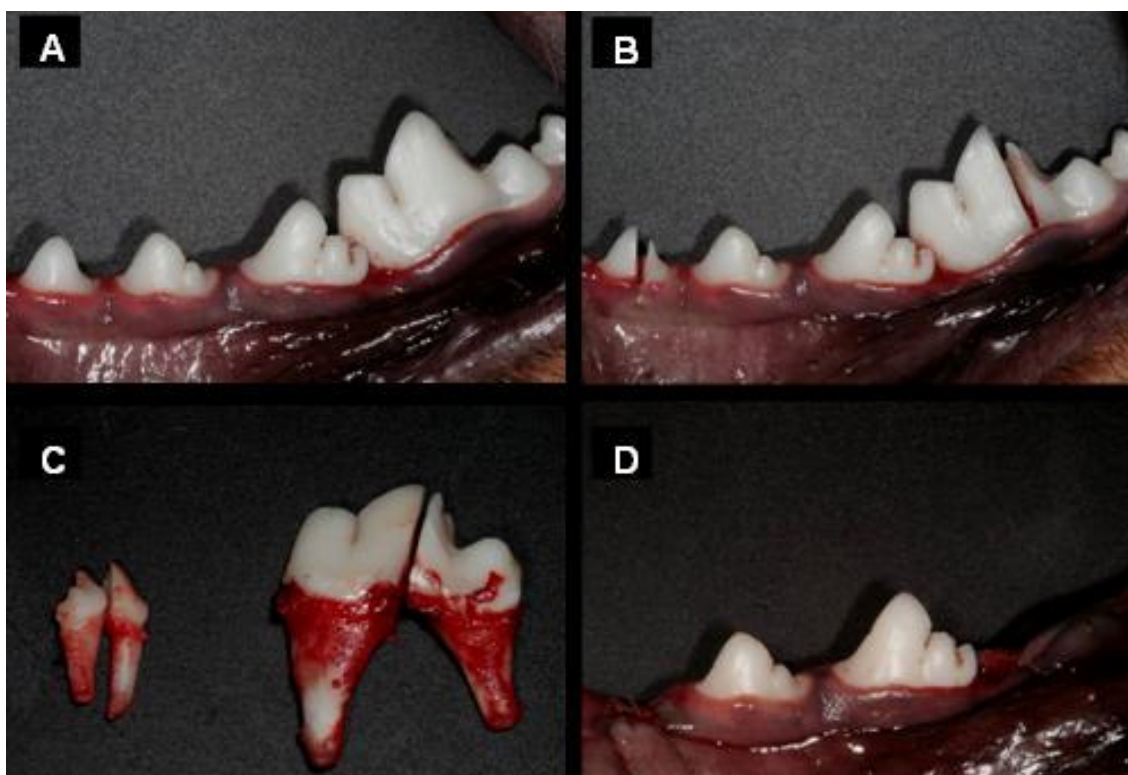
Nos dias das cirurgias os animais foram novamente sedados com cloridrato de dihidrotiazina, via intramuscular (Rompun®- Bayer do Brasil S.A, Socorro, SP, Brasil), na dose de 1,5mL/10 kg de peso corpóreo, e submetidos à anestesia geral por meio de injeção intravenosa de solução de 2,5% de tiopental sódico (Tiopental®- Cristália produtos químicos e farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil), na dose de 1mL/kg. A via intravenosa foi mantida com soro fisiológico durante o ato cirúrgico, possibilitando a hidratação do animal e a administração de doses de manutenção do anestésico. A área cirúrgica foi localmente anestesiada com lidocaína 2% (Merrel Lepetit Farmacêutica Ltda, Santo Amaro, SP, Brasil), contendo epinefrina (1:100.000), com o objetivo de reduzir o sangramento e assegurar um efeito anestésico adequado.

- Cirurgia de Exodontia:

Inicialmente foi realizada a cirurgia de exodontia dos 2<sup>os</sup> pré-molares e 1<sup>os</sup> molares inferiores (PM2 e M1) bilateralmente com o duplo objetivo de fornecer células do ligamento periodontal para serem cultivadas *in vitro* e de criar um espaço edêntulo à mesial do PM3 e distal do PM4, facilitando a adaptação das membranas e o posicionamento coronário do retalho. Para tanto, foram realizadas incisões intra-sulculares nas faces vestibulares e linguais desses dentes, seguidas da elevação de um retalho de espessura total. Os dentes a serem extraídos foram seccionados ao nível da bifurcação de suas raízes com auxílio de brocas (Carbide FG nº 701 - SS White Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) em alta rotação e irrigação contínua com soro fisiológico estéril. As raízes mesiais e distais foram removidas separadamente, os alvéolos curetados e os tecidos posicionados

e suturados com fio reabsorvível Vycril 4-0 (Ethicon, Jhonsons do Brasil AS, São José dos Campos, SP, Brasil) (Figura 1 a-d).

Após o procedimento cirúrgico, com o objetivo de minimizar o risco de infecção da área cirúrgica, os animais receberam uma injeção intramuscular de antibiótico (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Laboratório Wyeth – WhiteHall Ltda, São Paulo, SP, Brasil), na dose de 0,1mL/kg, a qual foi repetida quatro dias depois. Também foi administrado um antiinflamatório não-esteroidal (Flunixin Meglumine - Banamine® 10mg/mL, Ind. Quim. e Farm Schering-Plough S/A Veterinária, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), na dosagem de 1mL/10kg, por 3 dias consecutivos, via subcutânea, com o objetivo de controlar a dor e o edema pós-operatório. Durante um período de 15 dias, iniciando-se 12 horas após a cirurgia, os animais receberam dieta pastosa (ração em lata BomGuy, Dumilho SA Ind. e Com., Vila Velha, ES, Brasil) para prevenir qualquer trauma sobre a área operada.



**Figura 2.** Ilustração do procedimento cirúrgico para exodontia do PM2 e do M1. A) Aspecto inicial, anteriormente à exodontia. B) Odontossecção ao nível da bifurcação das raízes. C) Dentes após a extração. D) Sutura.

- Obtenção da Cultura Primária de Células do Ligamento Periodontal:

A cultura primária das células do ligamento periodontal foi obtida pela técnica descrita por Gronthos *et al.* (2000). Imediatamente após a extração dos segundos pré-molares e primeiros molares inferiores (PM2 e M1), estes foram colocados em tubos de centrifugação de 15ml tipo Falcon contendo o meio de biópsia composto por DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Médium), suplementado com soro fetal bovino (FBS) a 10%, 250µg/ml de sulfato de gentamicina, 5µl/ml de anfotericina B, 100µl/ml de estreptomicina e 100U/ml de penicilina (Gibco BRL, Life technologies, Rockville, MD, USA). Em seguida, os dentes foram lavados cinco vezes com meio de biópsia e, sobre uma placa de *petri* esterilizada (35x100mm), o ligamento periodontal do terço médio da raiz foi removido gentilmente com uma cureta cuja extremidade de corte se apresentava romba para evitar a remoção de lascas de cemento e dentina. O ligamento periodontal coletado foi digerido em uma solução de 3mg/ml de colagenase tipo I e 4mg/ml de dispase (Gibco BRL, Life technologies, Rockville, MD, USA) por 1 hora a 37°C. Logo depois, o ligamento periodontal digerido foi passado através de um "cell strainer" de 100µm (BD Falcon™, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) para a obtenção de uma suspensão celular, a qual foi centrifugada por 5 minutos a 2500 rpm. Após centrifugação, o "pellet" celular foi ressuspensionado em meio de biópsia, transferido para uma garrafa para cultivo celular de 25cm<sup>2</sup> (BD Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) e incubado em estufa umidificada a 37°C em atmosfera saturada em 5% de CO<sub>2</sub>.

Após a adesão e início da proliferação celular, o meio de biópsia foi substituído pelo meio de cultura padrão composto por DMEM, FBS a 10%, 100µg/ml de estreptomicina e 100U/ml de penicilina. Quando as células atingiram confluência, estas foram tripsinizadas com a solução de Tripsina 0,25% e EDTA 2,21mM (Gibco BRL, Life technologies, Rockville, MD, USA), ressuspensionadas em 10ml de meio de cultura padrão, transferidas para tubos de centrifugação de 15ml tipo Falcon e centrifugadas por 5 minutos a 2500rpm. Em seguida, o meio de

cultura foi aspirado e as células ressuspendidas em 3 a 5ml de DMSO – meio de congelamento (Gibco BRL, Life technologies, Rockville, MD, USA). Cada 0,5ml desta suspensão celular foi transferido para um “vial” e congelado em nitrogênio líquido. Somente células entre a primeira e a terceira passagem foram utilizadas para quaisquer dos experimentos.

#### 4.4- Caracterização do fenótipo das células do ligamento periodontal dos cães:

Após a obtenção da cultura das células do ligamento periodontal (PDLCs), com o intuito de demonstrar que as mesmas apresentavam o fenótipo cementoblástico-osteoblástico, foi realizado o ensaio de mineralização *in vitro* e a avaliação da expressão dos genes de colágeno tipo I (*COL I*), fosfatase alcalina (*ALP*) e sialoproteína óssea (*BSP*) por meio da reação em cadeia da polimerase pela técnica da transcriptase reversa (RT-PCR).

##### 4.4.1- Ensaio de Mineralização

O potencial das PDLCs em formar nódulos minerais *in vitro* foi avaliado por meio do ensaio Von Kossa realizado para as sete populações celulares obtidas. Para tanto, as células foram semeadas em placas de 24 poços a uma densidade de  $5 \times 10^4$  células por poço, em meio padrão, por 24 horas. Em seguida, o meio padrão foi substituído pelo meio de diferenciação osteogênico, composto por DMEM, FBS a 10%, 100µg/ml de estreptomicina, 100U/ml de penicilina, 50mg/ml de ácido ascórbico,  $10^{-5}$ M de dexametasona e 10mM de β-glicerol (Gibco BRL, life technologies, Rockville, MD, USA), sendo então incubadas em estufa umidificada a 37°C em atmosfera saturada em 5% de CO<sub>2</sub> e o meio trocado a cada dois dias. Após o período de 28 dias, o meio de cultura foi removido, a placa lavada com tampão fosfato salino (PBS- Gibco BRL, Life technologies, Rockville, MD, USA) em temperatura ambiente e as células foram fixadas em etanol 100% (1 ml por poço) por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida as células

foram re-hidratadas em concentrações decrescentes de etanol (100% até 50%, 5 minutos cada) e lavadas em água destilada por duas vezes. Depois de serem incubadas em uma solução de  $\text{AgNO}_3$  5% a 37°C, no escuro, por 1 hora, as células foram lavadas quatro vezes em água destilada e expostas à luz até que o mineral escurecesse. Então, foi realizada a desidratação das células em concentrações crescentes de etanol (50% até 100%, 2 minutos cada) e os poços secos ao ar livre.

#### 4.4.2- Análise da Expressão Gênica

##### 4.4.2.1. Extração do RNA total

Células do ligamento periodontal foram semeadas em pratos de cultura celular (100x20mm) e mantidas em meio de cultura padrão em atmosfera saturada em 5% de  $\text{CO}_2$ , a 37°C e 98% de umidade até atingirem subconfluência. Após esse período, o RNA total das sete populações celulares foi extraído utilizando o método do fenol/clorofórmio, a fim de avaliar a expressão dos genes para *COL I*, *ALP* e *BSP*. Para tanto, o meio de cultura celular foi aspirado, as células foram lavadas com 1ml de PBS (Gibco BRL, Life technologies, Rockville, MD, USA) e foi adicionado 1ml de Trizol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA). Após a homogeneização utilizando um “cell scraper” (BD Falcon™, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) as células foram incubadas em temperatura ambiente por 5 minutos. Foram adicionados 200µl de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Hessen, Germany), seguido de incubação por 10 minutos e centrifugação a 11500 rpm a 4°C por 15 minutos. A fase aquosa contendo o RNA total foi coletada, transferida para outro tubo e incubada com 500µl de isopropanol (Merck, Darmstadt, Hessen, Germany) por 10 minutos para precipitação do RNA. Após centrifugação a 11500rpm a 4°C por 15 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o “pellet” de RNA total adquirido foi lavado com 500µl de etanol 75% (Merck, Darmstadt, Hessen, Germany) e centrifugado a 11500rpm a 4°C por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi mantido em temperatura ambiente por cerca de 30 minutos para



secagem. Em seguida, o material foi ressuspenso em água tratada com DEPC (dietil pirocarbonato) e os tubos contendo as amostras foram armazenados a -70°C.

Para a verificação da qualidade dos RNAs obtidos, 1µg de RNA de cada amostra foi separado em um gel de agarose a 2%, por meio de eletroforese a 70V constante, por 40 minutos, em tampão contendo 20mM de MOPS, 5mM de acetato de sódio e 1mM de EDTA. O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado através do programa Image Master VDS (Amersham Pharmacia Biotech, Petah Tikva, Israel). A qualidade do material foi determinada pela presença e integridade das bandas do RNA ribossômico, 28S e 18S.

#### 4.4.2.2. Síntese de DNA complementar (cDNA)

As amostras de RNA extraídas, com comprovada qualidade, foram tratadas com DNase (Turbo DNA-free TM Kit – Applied Biosystems, Ambion, Austin, TX, USA) para eliminar possíveis traços de DNA genômico contaminante, seguindo as recomendações do fabricante. A síntese de cDNA foi feita a partir de 1µg de RNA total de cada amostra, utilizando-se o kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA), utilizando o “primer” oligo (dT), seguindo as instruções do fabricante.

#### 4.4.2.3. Desenho dos *primers* e realização das reações de RT-PCR

Os *primers* para Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase - *Gapdh* (gene de referência), *COL I*, *ALP* e *BSP* foram desenhados com o auxílio de um software (Roche Diagnosis GmbH, Mannheim, BW, Germany) e as reações para cada *primers* foram otimizadas anteriormente ao início das reações de PCR propriamente ditas (Tabela 1). Reações de amplificação foram realizadas através de um ciclo de pré-incubação a 95°C por 10 min e 40 ciclos (desnaturação a 95°C por 10 seg; anelamento a 55°C e extensão a 72°C por, respectivamente, 5seg/

7seg (*Gapdh*), 2seg/ 8seg (*COL I*), 3seg/ 6seg (*ALP*) e 5seg/ 7seg (*BSP*). A expressão de *Gapdh* foi utilizada para controle interno da integridade de RNA e da eficiência do processo de transcrição.

A amplificação das amostras foi visualizada em gel de agarose 2% (BioAgency Laboratories, San Diego, California, USA) em tampão tris-borato-EDTA (pH 8,0), contendo brometo de etídeo na concentração final de 0,25ug/ml para a expressão dos genes de interesse. Foi incluído, em cada gel, um padrão de peso molecular de 100pb (TrackIt™, Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Após o término de cada corrida (90volts/1hora), as bandas foram observadas com auxílio de um transluminador de luz ultravioleta Gel Logic 200 Image System (Carestream Health Inc, Rochester, NY, USA) e a captura das imagens foi realizada pelo programa computacional Kodak Molecular Imaging Software (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA).

Tabela 1. Sequência dos "primers" desenhados e as respectivas Tm's.

Gene	Primer	Tm (°C)
<i>Gapdh</i>	F- CCAGAACATCATCCCTGCT	60.7
	R- ACTACCTTCTTGATGTCGTCATATT	60.3
<i>ALP</i>	F- GGGCAACTCTATCTTTGGTCTG	60.7
	R- CTGGTAGTTGTTGTGAGCG	60.6
<i>BSP</i>	F- GGTACATAGGTCTAGCTGCAATC	60.3
	R- TGGTGCTGTTTATACCTTGCC	60.1
<i>COL-I</i>	F- GTGTCCGTGGTCTGACT	59.8
	R- TCACCTTTAGCACCAGGTTG	60.3

*Gapdh*: D-gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; *ALP*: Fosfatase Alcalina; *BSP*: Sialoproteína Óssea; *COL-I*: Colágeno tipo I

#### 4.5- Identificação das células no interior das esponjas de colágeno por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Com o intuito de ilustrar a capacidade carreadora da esponja de colágeno (BD™ 3D Collagen Composite Scaffold, Franklin Lakes, NJ, USA), 30  $\mu$ l de  $3 \times 10^5$  células foram semeadas nas esponjas, e estas foram colocadas em uma placa de cultura celular de 96 poços, sendo uma esponja/poço. Após 1 hora de incubação, foi acrescentado 100  $\mu$ l de DMEM 10% FBS em cada esponja/poço. Ao final do período de um dia, as esponjas foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) durante 24 horas. Uma esponja sem célula contendo apenas DMEM 10% FBS foi utilizada como controle. As amostras foram desidratadas por concentrações crescentes de acetona (50%, 75%, 85%, 90%, 95% e 100%) e ao final, foram desidratadas ao ponto crítico (Denton Vacuum DCP-1 – Critical Point, Denton Vacuum, Moorestown, NJ, USA) seguido de metalização em ouro (Denton Vacuum Desk II, Denton Vacuum, Moorestown, NJ, USA) e de análise em MEV com aumento variando entre 350 e 1000 vezes e aceleração entre 5 e 20 Kv. A análise das superfícies foi descritiva considerando a presença ou ausência de células.

#### 4.6- Confeção e Tratamento dos defeitos

Aproximadamente seis meses após a extração dos dentes, os animais foram novamente sedados com 1,5mL/10kg de cloridrato de dihidrotiazina (Rompun® - Bayer do Brasil S.A, Socorro, SP, Brasil), via intramuscular, e anestesiados por meio de injeção intravenosa de solução de 2,5% de tiopental sódico (Tiopental®, Cristália produtos químicos e farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil) para a criação dos defeitos de acordo com a técnica descrita por Wikesjö *et al.* (1994). Após a dissecação de um retalho mucoperiosteal vestibular e lingual na região dos 3<sup>os</sup> e 4<sup>os</sup> pré-molares inferiores (PM3 e PM4), o osso alveolar foi removido ao redor de toda a circunferência radicular com o auxílio de cinzéis e de instrumentos rotatórios sob irrigação abundante, até que a crista óssea

remanescente ficasse a uma distância de 5 mm da junção cimento-esmalte. Após vigorosa instrumentação da superfície radicular com o auxílio de curetas, objetivando remover todo o cimento dental, foram confeccionados sulcos de referência apical (“notches”) em ambas as raízes, no nível da crista óssea alveolar, com o auxílio de uma ponta Morse.

Visto que neste estudo foi utilizado o desenho experimental em bloco aleatório, em que cada animal recebeu todos os tratamentos, em cada cão (n=7) os defeitos (PM3 e PM4 bilaterais) foram aleatoriamente escolhidos (sorteio) para receber um dos seguintes tratamentos: Grupo Controle – a superfície radicular foi instrumentada com auxílio de curetas, e os retalhos, vestibular e lingual, foram posicionados coronariamente (n=7); Grupo RTG – após instrumentação da superfície radicular, duas membranas reabsorvíveis foram posicionadas por vestibular e lingual anteriormente ao posicionamento coronário do retalho (n=7); Grupo Esponja – em associação com a RTG, uma esponja de colágeno, embebida em DMEM, foi introduzida na região do defeito (n=7); Grupo Células - células do ligamento periodontal, embebidas na esponja de colágeno, foram transplantadas para a região do defeito em associação com a RTG (n=7).

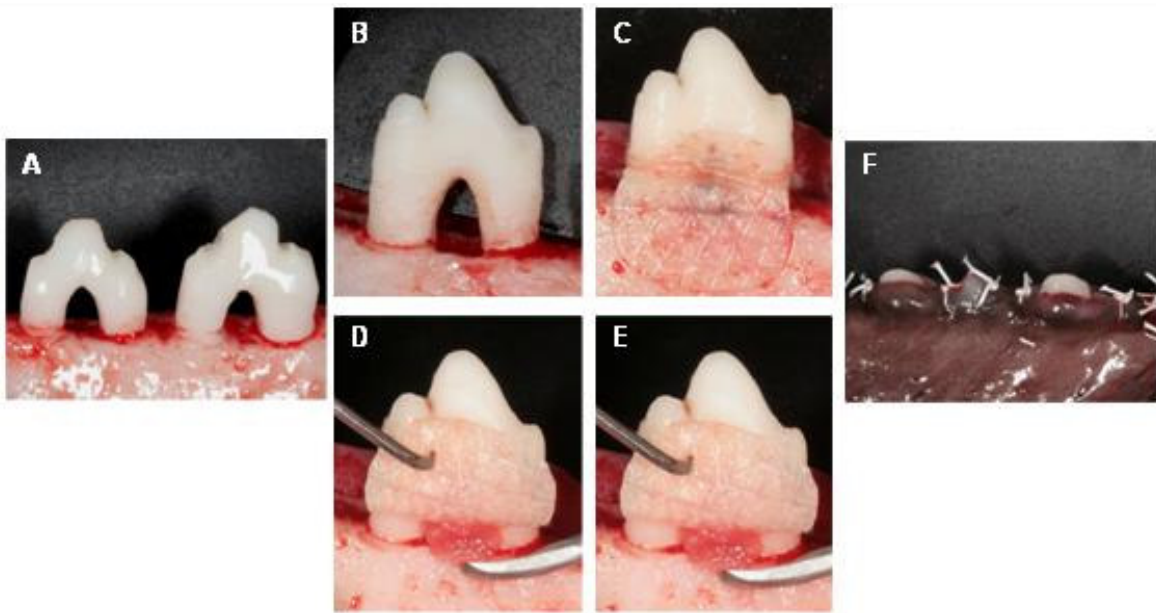
Nos defeitos em que foi utilizada a RTG, duas membranas reabsorvíveis de um copolímero de ácido glicólico-lático (Resolut XT<sup>®</sup>, Regenerative Material, Gore-tex, Gore Associates, Flagstaff, AZ, USA) foram adaptadas por vestibular e por lingual dos pré-molares. As membranas foram recortadas de maneira que, quando posicionadas sobre o defeito, recobrissem sua área vestibular e lingual e se estendessem sobre o osso adjacente cerca de 2 a 3 mm. As membranas foram mantidas em posição através de sutura suspensória realizada com fio reabsorvível (Gore Resolut suture<sup>®</sup>, Gore-tex, Gore Associates, Flagstaff, AZ, USA). Nos grupos que receberam o arcabouço de colágeno, associado ou não às PDLCs, primeiramente foi realizada a adaptação e sutura das membranas para que depois a esponja pudesse ser introduzida no interior do defeito recoberto por estas barreiras. Em todos os sítios, os retalhos foram posicionados coronariamente e suturados (com suturas suspensórias e interrompidas) com fio de PTFE-e (Gore-

tex sutures, WL, Gore, Flagstaff, AZ, USA) (Figura 2).

Para o tratamento do dentes do grupo Células, 30 µl de  $3 \times 10^5$  células foram semeadas nas esponjas e mantidas em meio de cultura padrão em atmosfera saturada em 5% de CO<sub>2</sub>, 37°C e 98% de umidade por um período de 24 horas. Com o intuito de evitar reações imunológicas decorrentes do uso do soro fetal bovino (FBS), as células carregadas na esponja de colágeno foram mantidas em DMEM na ausência de FBS por um período de 12 horas (“serum starvation”) previamente ao transplante (Tvaluc *et al.*, 2007). Nos dentes do grupo Esponja, os defeitos receberam as esponjas de colágeno apenas embebidas em DMEM na ausência de soro fetal bovino, sem as células carregadas.

Imediatamente após o procedimento cirúrgico, com o objetivo de minimizar o risco de infecção da área cirúrgica, os animais receberam uma injeção intramuscular de antibiótico (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Laboratório Wyeth – WhiteHall Ltda, São Paulo, SP, Brasil), na dose de 0,1mL/kg, que foi repetida quatro dias depois. Também foi administrado um antiinflamatório não-esteroidal (Flunixin Meglumine - Banamine® 10mg/mL, Ind. Quim. e Farm Schering-Plough S/A Veterinária, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), na dosagem de 1mL/10kg, por 3 dias consecutivos, via subcutânea, com o objetivo de controlar a dor e o edema pós-operatório.

Aproximadamente 14 dias após a cirurgia os animais foram sedados com injeção intramuscular de 1,5mL/10kg de cloridrato de dihidrotiazina (Rompun® - Bayer do Brasil S.A, Socorro, SP, Brasil) para remoção das suturas. Neste mesmo momento, foi realizada profilaxia com taças de borracha e pasta profilática para controle mecânico do biofilme o qual foi repetido semanalmente durante um mês sempre sob sedação. A aplicação tópica diária de digluconato de clorexidina 0,2% na forma de spray foi iniciada imediatamente após a cirurgia e mantida até o momento do sacrifício. Durante todo este período pós-operatório, os animais permaneceram com colar protetor elizabetano e receberam alimentação pastosa em lata (BomGuy, Dumilho SA, Indústria e Comércio, Vila Velha, ES, Brasil) com o objetivo de evitar traumatismos sobre a região operada.



**Figura 3.** Ilustração do procedimento cirúrgico de confecção e tratamento dos defeitos. **A)** Aspecto inicial dos dentes após a confecção dos defeitos; **B)** Grupo Controle - superfície radicular instrumentada com auxílio de curetas; **C)** Grupo RTG – RTG; **D)** Grupo Esponja - RTG + esponja de colágeno; **E)** Grupo Células - RTG + células do ligamento periodontal embebidas em esponja de colágeno; **F)** Retalho posicionado coronariamente e suturado.

#### 4.7 - Processamento Histológico:

Decorridos 90 dias dos procedimentos cirúrgicos de tratamento dos defeitos, os animais foram anestesiados por meio de injeção intravenosa de solução de 2,5% de tiopental sódico (Tiopental<sup>®</sup>, Cristália produtos químicos e farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brasil) e sacrificados pela técnica de perfusão endovenosa de formol a 4%. As arcadas foram dissecadas e divididas em blocos, contendo os defeitos, os quais foram mantidos por 48 horas em solução de formol a 4% (ph 7,4).

Os blocos foram descalcificados em solução de Morse (ácido fórmico a 50%, citrato de sódio a 20% em água destilada). O progresso da descalcificação foi avaliado com perfurações em áreas que não eram de interesse para análise.

Após um período total no descalcificador de 4 meses, os espécimes foram lavados em água corrente por 12 horas, colocados em solução de sulfato de sódio a 5% por 48 horas e novamente lavados por 4 horas em água corrente, procedendo-se a processamento histológico de rotina, com desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Os blocos foram seccionados com espessura de 6µm e orientação vestibulo-lingual, obtendo-se seis lâminas por bloco, incluindo a primeira e a última lâmina na qual os “notches” eram visualizados em ambas as raízes. Essa duas lâminas serviram de referência para a seleção das outras quatro lâminas distanciadas igualmente entre si. Desta maneira, os cortes selecionados correspondiam às porções vestibular, mediana e lingual do defeito. Posteriormente, estas lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE), pela técnica de rotina.

#### 4.8 - Análise Histométrica:

Objetivando evitar qualquer interferência, consciente ou não, nos resultados do experimento, previamente à leitura das lâminas estas foram codificadas por um pesquisador de fora do trabalho garantindo a realização de um estudo cego. Também anteriormente à realização da análise histométrica foi realizada a calibração intra-examinador. Para tal foram selecionadas aleatoriamente 10% do total de lâminas, sendo realizadas duas leituras com intervalo de uma semana de diferença. A correlação intra-classe revelou um coeficiente de correlação superior a 0,97 para todos os parâmetros o que correspondia a um intervalo de confiança de 95%.

A avaliação histométrica foi realizada em imagens digitalizadas dos cortes histológicos selecionados, obtidas com uma câmera digital (Leica DFC-280, Japan) acoplada a um microscópio (Zeiss MC 80 DX, Germany), utilizando a objetiva de 2,5X. As mensurações foram feitas utilizando um sistema computadorizado de análise de imagens (Image Pro Plus 3.0, Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland). Foram obtidas as médias para cada parâmetro

histométrico em cada animal (n=7), após medir os seis cortes selecionados para cada dente.

#### Medidas lineares

As medidas lineares (em mm) foram obtidas nas raízes mesial e distal, em toda a extensão do defeito (Figura 4):

- Extensão total do defeito (ETD): extensão total da superfície radicular compreendida entre os dois sulcos de referência apical, nas raízes mesial e distal.
- Extensão não preenchida do defeito (ENP): porção da ETD sem contato com os tecidos neoformados, correspondente à recessão gengival.
- Novo cimento (NC): extensão linear da superfície radicular coberta por novo cimento.
- Regeneração Periodontal (RP): extensão linear da superfície radicular coberta por NC adjacente ao osso alveolar neoformado, com fibras colágenas orientadas funcionalmente.
- Extensão de epitélio/conjuntivo (EEC): extensão linear da superfície radicular coberta por epitélio ou tecido conjuntivo, correspondente ao epitélio juncional longo ou adaptação conjuntiva.
- Anquilose (ANQ): porção da ETD em contato direto com tecido ósseo.

#### Medidas de área

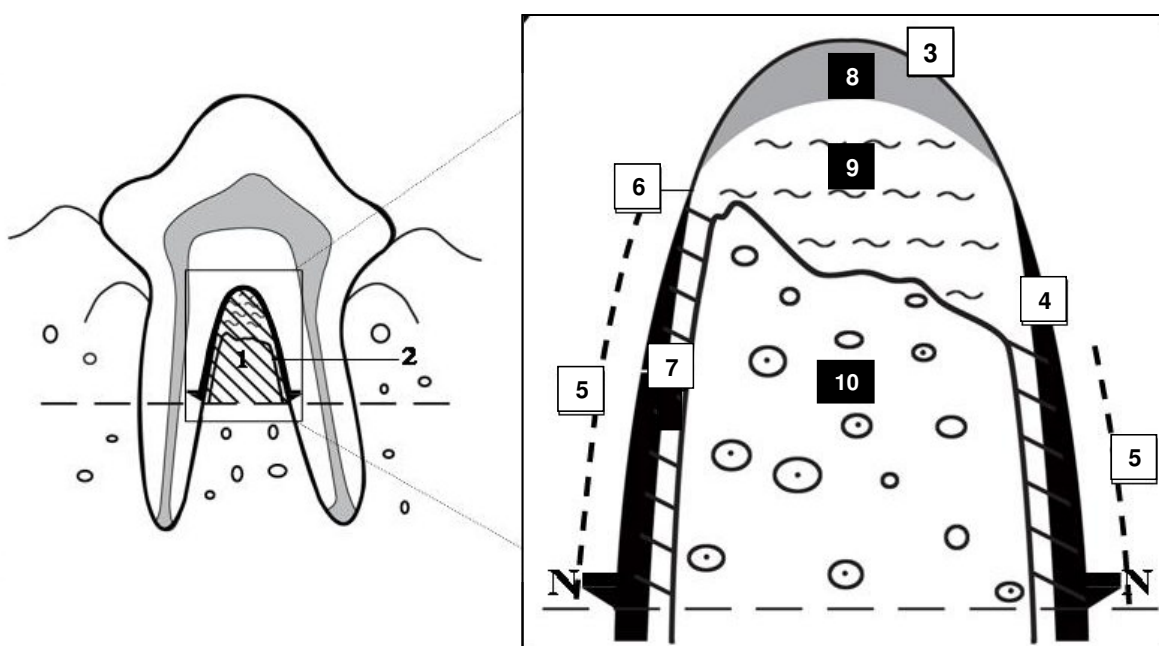
O limite apical do defeito (N) foi definido por uma linha conectando os dois sulcos de referência apical, nas raízes mesial e distal (Figura 4). As medidas de área (em mm<sup>2</sup>) obtidas foram:

- Área total do defeito (ATD): área limitada pelo limite apical do defeito e a superfície radicular.
- Área não preenchida (ANP): porção da ATD não preenchida por tecidos, correspondente à recessão gengival.
- Área de novo osso (NO): porção da ATD ocupada por novo osso.



- Área de epitélio/tecido conjuntivo (AEC): porção da ATD ocupada por epitélio e tecido conjuntivo.

Para a mensuração das medidas de área foi utilizado um recurso do sistema computadorizado de análise de imagens (Image Pro Plus 3.0, Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland) que permitiu o posicionamento de um retículo de 0,15 x 0,15mm sobre a imagem do defeito. As intersecções das linhas sobre tecido ósseo neoformado foram marcadas para calcular a área de novo osso ao multiplicar o total de pontos marcados por 0,0225mm<sup>2</sup> (área dos quadrados do retículo). O mesmo foi realizado para calcular a área não preenchida, a área de epitélio/tecido conjuntivo e a área total do defeito.



**Figura 4** - Representação gráfica das medidas histométricas:

- |  |  |
|--|--|
| 1 - Área total do defeito (ATD)          | 6 - Extensão de epitélio/tec. conjuntivo (EEC) |
| 2 - Extensão total do defeito (ETD)      | 7 - Anquiose (ANQ)                             |
| 3 - Extensão não preenchida (ENP)        | 8 - Área não preenchida (ANP)                  |
| 4 - Extensão de novo cemento (NC)        | 9 - Área de epitélio/tecido conjuntivo (AEC)   |
| 5 - Regeneração Periodontal (RP)         | 10 - Área de novo osso (NO)                    |
| N - Sulco de referência apical ("notch") |  |

#### 4.9 - Análise Estatística

Foram obtidos a média e o desvio padrão para cada parâmetro, em que cada animal foi considerado um bloco, recebendo os quatro tratamentos caracterizando um delineamento experimental em blocos ao acaso.

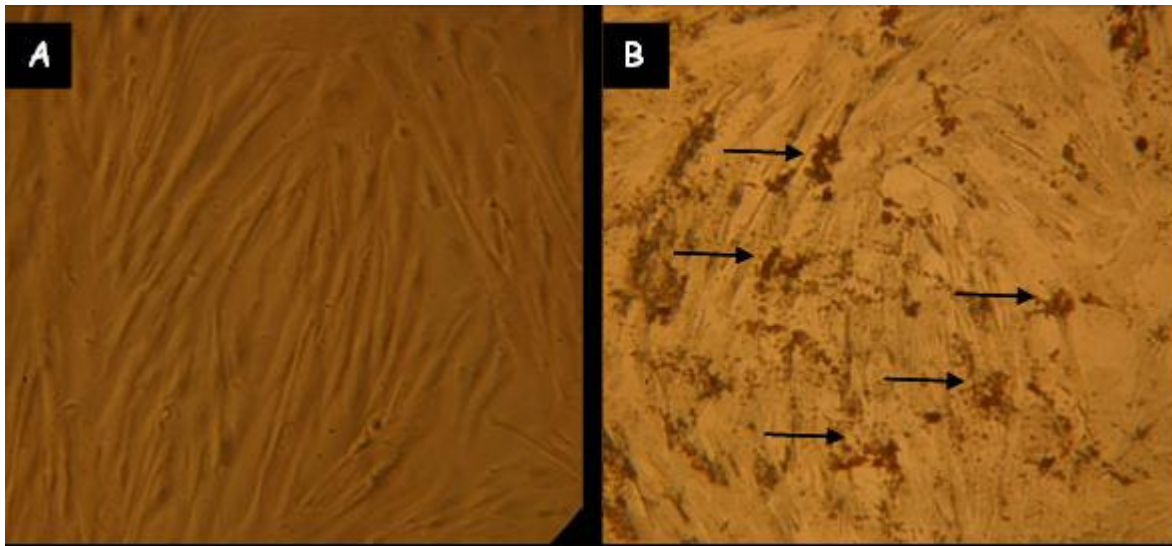
Uma vez que os dados histométricos atenderam às pré-suposições da análise exploratória, a análise intergrupos foi realizada, similarmente, utilizando o ANOVA 2 WAY, que considerou os fatores "cão" e "tratamento", e teste de Tukey, com nível de significância de 5% ( $P \leq 0,05$ ). O programa utilizado foi o SAS versão 9.1, 2003 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA).

## 5 – RESULTADOS

### 5.1- Caracterização fenotípica das células do ligamento periodontal

- Ensaio de mineralização

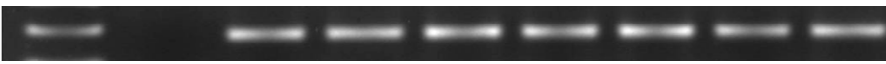



O potencial das PDLCs em formar nódulos minerais *in vitro* quando cultivadas em meio osteogênico (ácido ascórbico,  $\beta$ -glicerolfosfato e dexametasona) foi avaliado através do ensaio Von Kossa. Os resultados demonstraram que após 28 dias, sem exceção, as células obtidas dos sete (7) animais apresentavam a capacidade de produzir nódulos minerais (Figura 5).



**Figura 5.** Ilustração dos resultados observados após ensaio de Von Kossa (28 dias).: A) Grupo Controle: Células cultivadas em meio contendo DMEM + 10% de FBS. B) Grupo Teste: Células cultivadas em meio de diferenciação osteogênica. Pode-se observar que a células obtidas possuem uma alta capacidade de formação de nódulos minerais (setas) *in vitro*, confirmando o fenótipo esperado.

- Expressão gênica

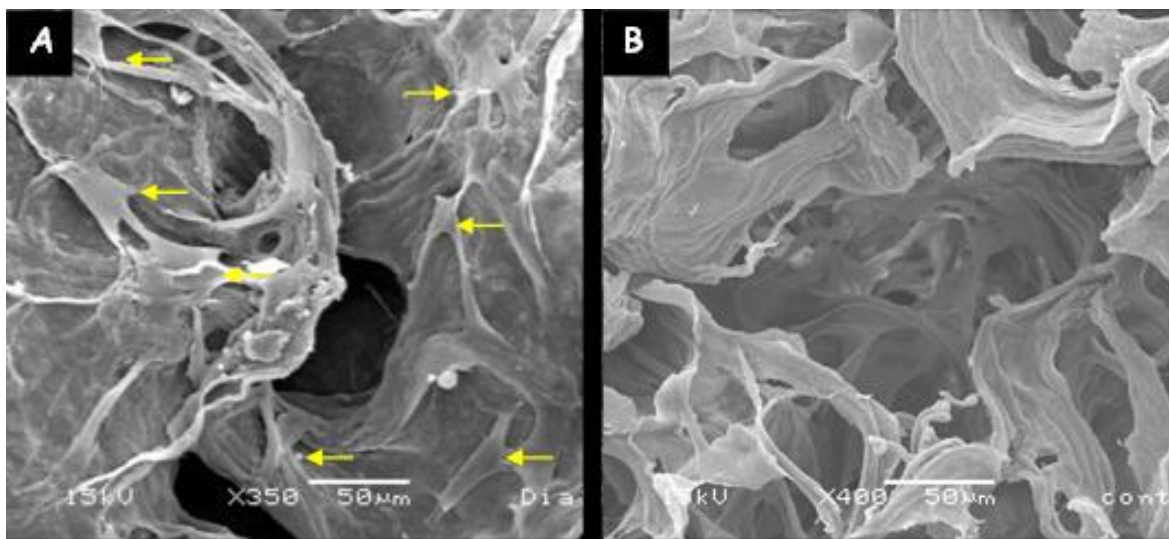
Com o intuito de demonstrar que as PDLCs obtidas apresentavam o fenótipo cementoblástico-osteoblástico esperado, foi realizada uma caracterização por meio do RT-PCR quanto à expressão dos genes para colágeno tipo I, fosfatase alcalina e sialoproteína óssea. Os resultados demonstram claramente que para todos os animais, embora em níveis variados, as células obtidas expressam os genes esperados (*COL I*, *ALP* e *BSP*) (Figura 6).

		"Ladder"	Controle							
			Negativo	Cão 1	Cão 2	Cão 3	Cão 4	Cão 5	Cão 6	Cão 7
Gapdh	200pb									
BSP	200pb									
ALP	200pb									
COL I	200pb									

**Figura 6.** Ilustração da documentação fotográfica dos géis de agarose 2% para os genes *Gapdh*, *BSP*, *ALP*, *COL-I*.

## 5.2- Identificação das células no interior das esponjas de colágeno (MEV)

A fim de avaliar a morfologia das células obtidas bem como sua propagação e aderência à esponja de colágeno, 30µl de  $3 \times 10^5$  células foram semeadas nas esponjas e avaliadas ao MEV. Após o período de 24 horas em cultura, as células apresentavam-se fixas e dispersas no interior das esponjas de colágeno apresentando aspecto morfológico semelhante a fibroblasto, confirmando a capacidade carreadora da esponja de colágeno (Figura 7).



**Figura 7.** Fotomicrografia eletrônica de varredura da esponja de colágeno. A) Setas indicam as células aderidas no interior da esponja de colágeno após 24 horas em cultura (350x). B) Grupo controle no qual nenhuma célula foi observada (esponja de colágeno sem células, 400x).

### 5.3 - Observações Clínicas

Durante todo o período de cicatrização, não ocorreu supuração ou formação de abscessos. Em todos os defeitos do Grupo Controle houve retração gengival expondo a área de furca. Em alguns casos nos demais grupos houve retração de cerca de 2,5 mm da margem gengival com exposição da parte coronal da membrana; nestes casos (4, 3 e 3 defeitos nos grupos RTG, Esponja e Células, respectivamente) o controle pós operatório do biofilme foi realizado com a aplicação de digluconato de clorexidina a 1%, na forma de spray, duas vezes ao dia durante todo o período pós-operatório, e não houveram maiores complicações. No dia do sacrifício os tecidos moles estavam completamente cicatrizados, sem sinais clínicos de inflamação.

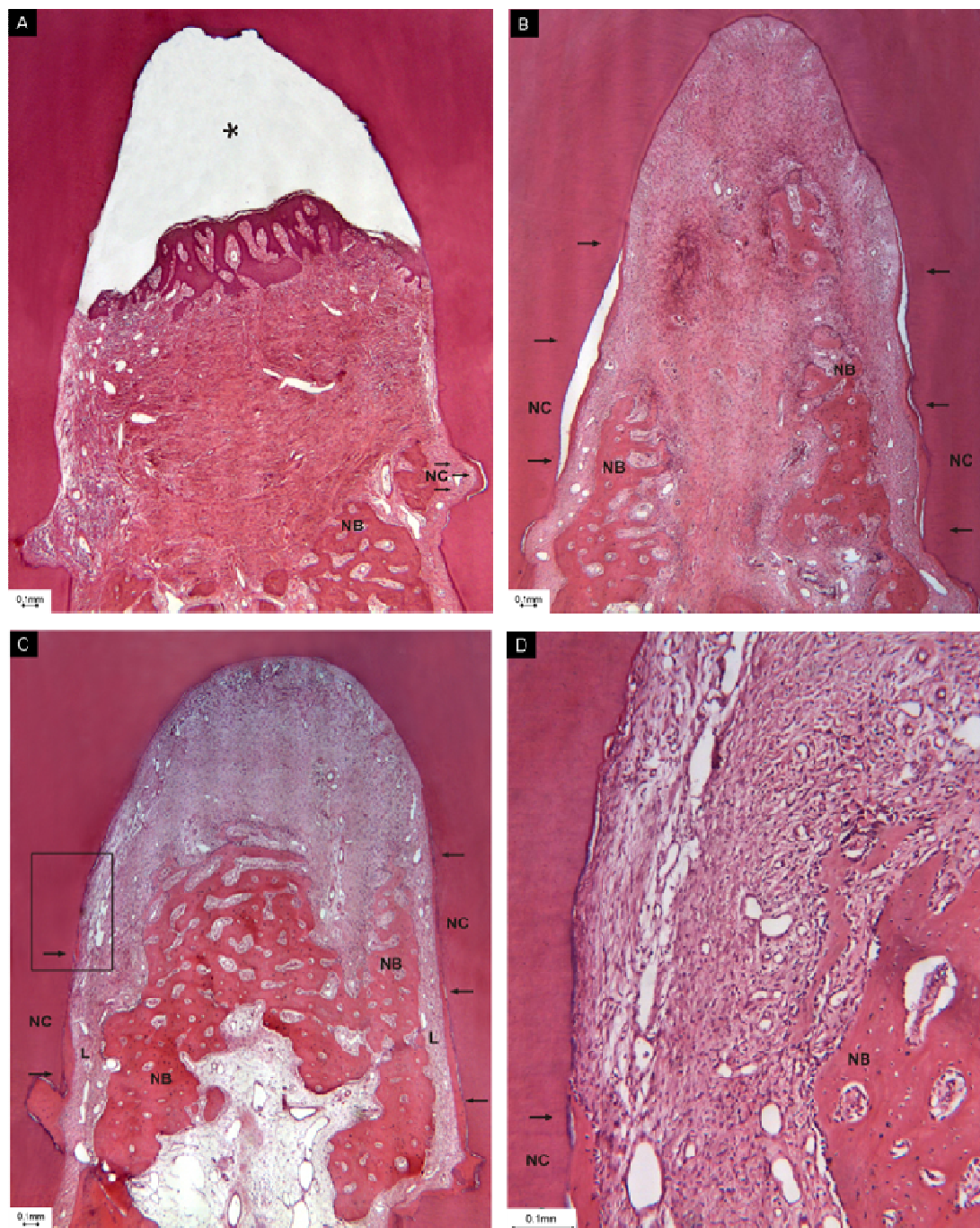
#### 5.4- Análise Histológica

A análise histológica mostrou que a região do defeito estava ocupada por epitélio, tecido conjuntivo, ligamento periodontal, cimento e osso. Diferentes estágios de maturação óssea e organização dos tecidos periodontais foram observados nos defeitos cicatrizados. Com frequência, houve formação óssea incompleta e grandes espaços medulares estavam presentes no osso neoformado. A presença de fibras colágenas funcionalmente orientadas sempre estava associada à presença de novo osso adjacente a novo cimento.

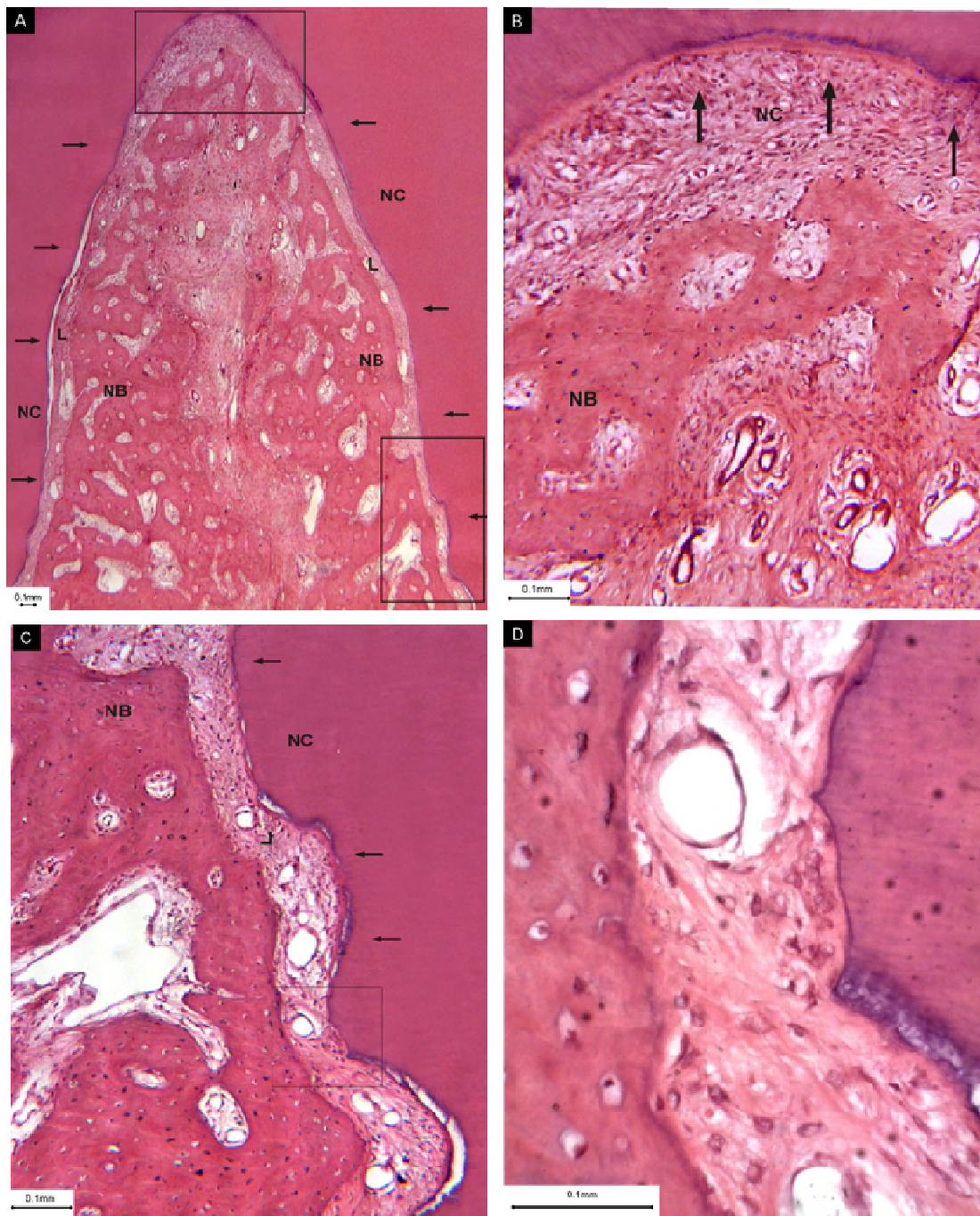
No grupo Controle, nenhum defeito apresentava-se completamente preenchido. Aproximadamente 40% da área total do defeito encontrava-se vazia correspondente à área de retração gengival enquanto um tecido conjuntivo coberto por tecido epitelial era observado ocupando quase toda a área restante. A presença de novo osso e de novo cimento com fibras inseridas estavam limitadas à região do “notch” (Figura 8A).

No grupo RTG, os defeitos apresentavam cerca de 30% da região de furca preenchido por tecido conjuntivo recoberto por tecido epitelial (Figura 8B). Nos grupos Esponja e Células foram observadas áreas de anquilose óssea. No grupo Esponja, a camada de cimento era mais irregular não recobrindo toda a extensão do defeito (Figuras 8C e D). Dois defeitos do grupo Células apresentaram preenchimento completo, e nestes casos (33,33%) houve a formação de novo cimento sobre toda a extensão da superfície radicular na região do defeito (Figuras 9 A-D).





**Figura 8.** Fotomicrografias ilustrativas dos resultados histométricos. A) Grupo Controle – Observe que aproximadamente 40% da área do defeito encontrava-se vazia (\*) enquanto um tecido conjuntivo coberto por tecido epitelial ocupa quase toda a área restante. A presença de novo osso (NB) e de novo cimento (NC-setas) com fibras inseridas estavam limitadas à região do “notch”. B) Grupo RTG – Observe que grande área do defeito está preenchida por tecido conjuntivo. Note que a presença de NB e NC está limitada à metade apical do defeito. C) Grupo Esponja – Observe um maior preenchimento ósseo (NB) do defeito e uma maior extensão de NC. D) Maior aumento da área delimitada em C – Observe a formação de NC adjacente à NB embora não haja uma cobertura de toda extensão do defeito. Cortes mesio-distais, coloração H&E.



**Figura 9.** Fotomicrografias ilustrativas dos resultados histométricos. A) Grupo Células – Observe um preenchimento completo do defeito com maior formação óssea (NB) e formação de novo cimento (NC) sobre toda a extensão da superfície radicular. B) Maior aumento da área delimitada no teto da furca na figura A – Observe a formação de NC sobre toda a região do teto da furca. C) Maior aumento da área delimitada na figura A – Observe o ligamento periodontal entre novo cimento (NC) e novo osso (NB). D) Maior aumento da área delimitada na figura C – Observe as fibras do ligamento periodontal perpendiculares ao novo cimento. Cortes mesio-distais, coloração H&E.



## 5.5 – Análise Histométrica

A análise dos dados não mostrou diferenças significativas entre os grupos quanto à área total do defeito (ATD) e quanto à extensão total do defeito (ETD).

Os resultados histométricos dos parâmetros lineares são mostrados na tabela 2. A análise intergrupo demonstrou uma maior extensão de novo cemento (NC) nos defeitos tratados com células quando comparado com outros grupos ( $1,70 \pm 0,60$  mm;  $2,87 \pm 0,74$  mm;  $3,66 \pm 0,95$  mm e  $4,82 \pm 0,61$  mm, para os grupos controle, RTG, Esponja e Células, respectivamente;  $p < 0,001$ ).

A análise dos dados demonstrou que a extensão da regeneração periodontal (RP), ou seja, formação de novo cemento adjacente ao osso alveolar neoformado, com fibras colágenas orientadas funcionalmente, foi maior para o grupo no qual as células foram aplicadas ( $0,69 \pm 0,59$  mm;  $1,52 \pm 0,39$  mm;  $2,33 \pm 0,95$  mm e  $3,43 \pm 1,44$  mm, para grupos controle, RTG, Esponja e Células, respectivamente;  $p = 0,001$ ). Diferenças estatisticamente significativas não foram observadas nos parâmetros lineares restantes.

Os resultados das medidas histométricas lineares, expressos em porcentagem da distância ocupada por cada parâmetro ao longo de toda a superfície de radicular são apresentados na Figura 10. O grupo em que foram aplicadas as células revelou uma porcentagem mais elevada de regeneração periodontal ( $8,67 \pm 6,87\%$ ;  $18,24 \pm 3,94\%$ ;  $27,87 \pm 10,63\%$  e  $42,69 \pm 24,12\%$ , para grupos controle, RTG, Esponja e Células, respectivamente;  $p = 0,0008$ ) e uma menor porcentagem de adaptação de tecido mole ( $39,42 \pm 15,16\%$ ;  $29,26 \pm 3,73\%$ ;  $30,24 \pm 14,89\%$  e  $16,71 \pm 11,14\%$ , para grupos controle, RTG, Esponja e Células, respectivamente;  $p = 0,0282$ ). Os parâmetros restantes não apresentavam diferença estatisticamente significativa.

Comparando os quatro grupos experimentais com relação às medidas de área do defeito, a análise de dados revelou uma maior área de novo osso (NO) nos defeitos tratados com células ( $1,89 \pm 0,95$  mm<sup>2</sup>;  $2,91 \pm 0,56$  mm<sup>2</sup>;  $3,94 \pm 1,52$  mm<sup>2</sup> e  $5,45 \pm 1,58$  mm<sup>2</sup>, para grupos controle, RTG, Esponja e Células

respectivamente;  $p=0,0012$ ). Uma menor área não preenchida (ANP) foi observada nos grupos esponja e células ( $4,41 \pm 0,83 \text{ mm}^2$ ;  $3,34 \pm 1,42 \text{ mm}^2$ ;  $2,23 \pm 1,95 \text{ mm}^2$  e  $1,56 \pm 1,30 \text{ mm}^2$ , para grupos controle, RTG, esponja e células, respectivamente;  $p = 0,0070$ ). Não foi observada diferença estatisticamente significativa no parâmetro área de epitélio/tecido conjuntivo (AEC) (Tabela 3). Os resultados das medidas de área, expressos em porcentagem de preenchimento da área total do defeito, são apresentados na Figura 11.

Tabela 2. Média e desvio padrão dos parâmetros histométricos lineares.

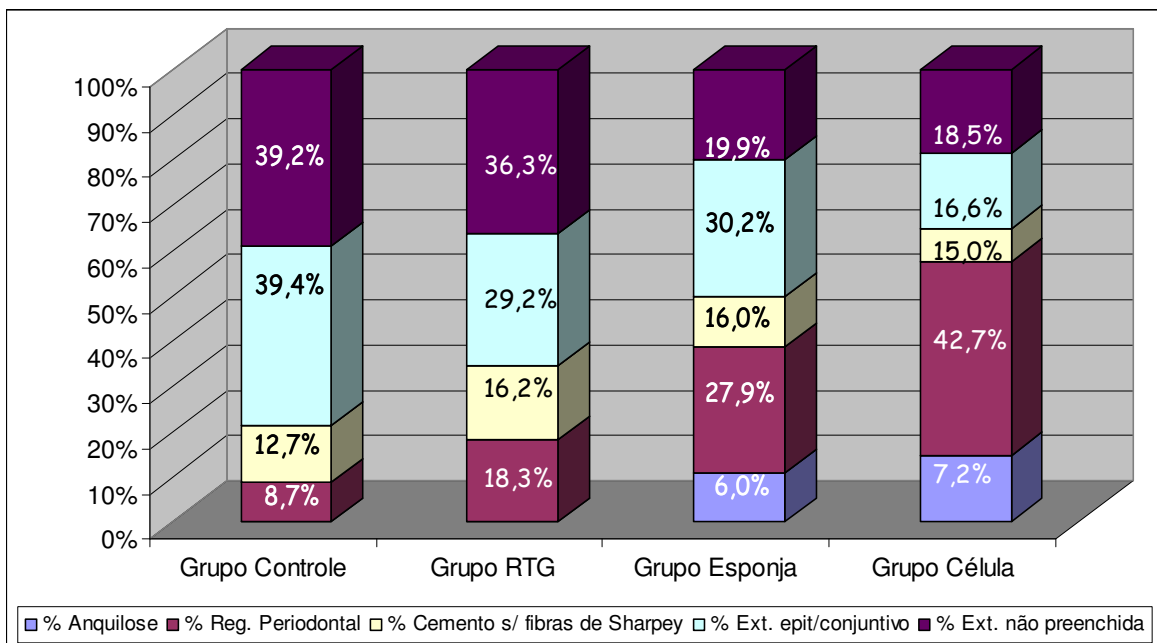
	Grupo Controle (n=7)	Grupo RTG (n=7)	Grupo Esponja (n=7)	Grupo Célula (n=7)
Extensão total do defeito	7,93 ± 0,75 <b>A</b>	8,30 ± 0,67 <b>A</b>	8,30 ± 0,65 <b>A</b>	8,58 ± 1,29 <b>A</b>
Extensão não preenchida	3,04 ± 1,65 <b>A</b>	3,02 ± 0,58 <b>A</b>	1,62 ± 1,14 <b>A</b>	1,74 ± 1,40 <b>A</b>
Novo cimento	1,70 ± 0,60 <b>C</b>	2,87 ± 0,74 <b>BC</b>	3,66 ± 0,95 <b>AB</b>	4,82 ± 0,61 <b>A</b>
Regeneração periodontal	0,69 ± 0,59 <b>C</b>	1,52 ± 0,39 <b>BC</b>	2,33 ± 0,95 <b>AB</b>	3,43 ± 1,44 <b>A</b>
Ext. epitélio/conjuntivo	3,19 ± 1,52 <b>A</b>	2,42 ± 0,26 <b>A</b>	2,47 ± 1,22 <b>A</b>	1,53 ± 1,08 <b>A</b>
Anquilose	0,00 ± 0,00 <b>A</b>	0,00 ± 0,00 <b>A</b>	0,55 ± 1,35 <b>A</b>	0,50 ± 0,78 <b>A</b>

Médias, na linha, seguidas de letras distintas diferem estatisticamente, entre si, pelos testes ANOVA 2 WAY e de Tukey (p< 0,05).

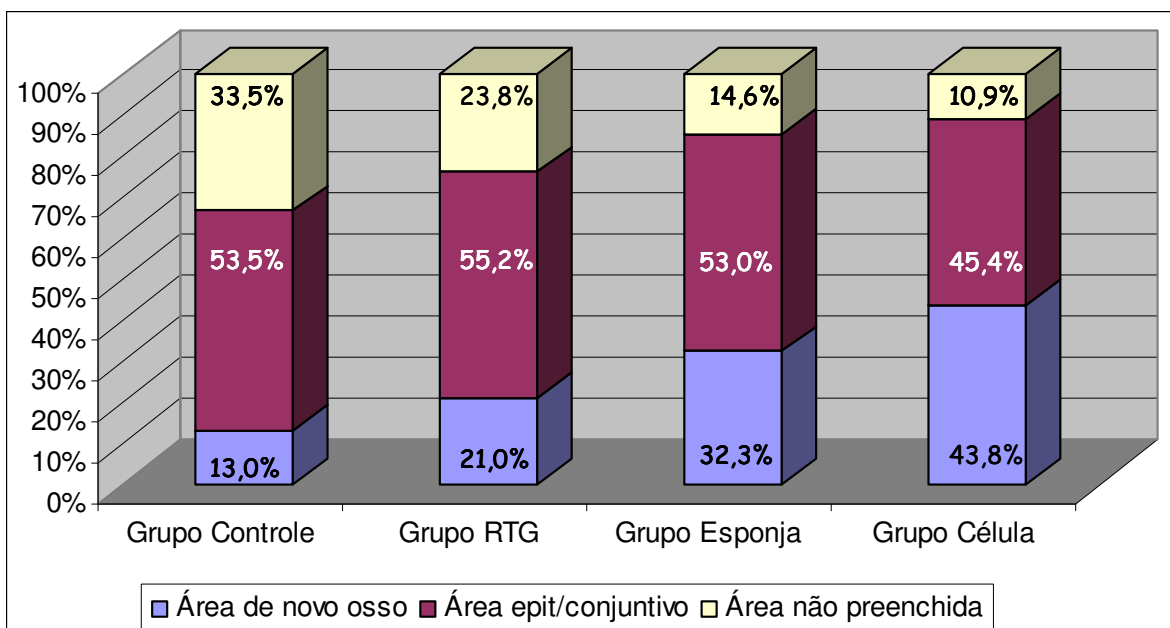
Tabela 3. Média e desvio padrão dos parâmetros histométricos de área.

	Grupo Controle (n=7)	Grupo RTG (n=7)	Grupo Esponja (n=7)	Grupo Célula (n=7)
Área total do defeito	13,52 ± 3,17 <b>A</b>	13,84 ± 1,93 <b>A</b>	13,46 ± 3,18 <b>A</b>	13,11 ± 2,70 <b>A</b>
Área não-preenchida	4,41 ± 0,83 <b>A</b>	3,34 ± 1,42 <b>A</b>	2,23 ± 1,95 <b>B</b>	1,56 ± 1,30 <b>B</b>
Área de novo osso	1,89 ± 0,95 <b>B</b>	2,91 ± 0,56 <b>B</b>	3,94 ± 1,52 <b>B</b>	5,45 ± 1,58 <b>A</b>
Área de epit/conjuntivo	7,22 ± 2,15 <b>A</b>	7,59 ± 1,47 <b>A</b>	7,29 ± 2,58 <b>A</b>	6,10 ± 2,46 <b>A</b>

Médias, na linha, seguidas de letras distintas diferem estatisticamente, entre si, pelos testes ANOVA 2 WAY e de Tukey (p< 0,05).



**Figura 10.** Porcentagem da distância (em mm) ocupada pelos parâmetros histométricos nas raízes mesial e distal, em toda a extensão do defeito (delimitado pelos “notches”).



**Figura 11.** Porcentagem do espaço ocupado (em mm<sup>2</sup>) pelos parâmetros histométricos na área do defeito delimitado apicalmente por uma linha conectando os dois “notches”.

## 6. DISCUSSÃO

Visando aumentar a previsibilidade de sucesso dos procedimentos periodontais regenerativos até então utilizados, a engenharia tecidual tem sugerido a possibilidade do uso da terapia celular no tratamento de defeitos periodontais. Sendo assim, o presente estudo se propôs a avaliar histometricamente, a regeneração de defeitos de furca grau III tratados com o transplante autólogo de células de ligamento periodontal (PDLCs) associada à regeneração tecidual guiada (RTG). Os resultados obtidos demonstraram que os defeitos que receberam as PDLCs (Grupo Células) apresentaram um resultado final positivo evidenciado por uma maior extensão de novo cemento e de regeneração periodontal e por uma maior área de osso neoformado.

Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores, que demonstraram o potencial da engenharia de tecidos ao utilizar a aplicação *in situ* de PDLCs na regeneração periodontal (Dogan *et al.*, 2002; Nakahara *et al.*, 2004; Akizuki *et al.*, 2005; Murano *et al.*, 2006). Nakahara *et al.* (2004) e Akizuki *et al.* (2005), avaliando o efeito das PDLCs aplicadas sobre defeitos de fenestração e deiscência, respectivamente, demonstraram que estas células induziam a regeneração de cemento sobre a superfície radicular. Uma possível explicação para este achado seria o fato de que células indiferenciadas presentes no ligamento periodontal, quando em contato direto com a superfície radicular, *in vivo*, se diferenciam em cementoblastos resultando em uma maior formação de cemento (Aukhil *et al.*, 1986). No presente estudo, os defeitos de furca grau III tratados com as PDLCs apresentaram uma maior extensão de novo cemento quando comparado aos demais grupos. Cerca de 60% da superfície radicular dos defeitos do grupo Células estava recoberta por cemento com e sem fibras de Sharpey inseridas. Uma maior extensão de cemento também foi observada por Murano *et al.* (2006) em defeitos semelhantes (furca III) tratados com PDLCs. Mesmo sem a associação de um material carreador ou de uma membrana para RTG, os autores observaram que, nos defeitos do grupo teste, aproximadamente

98% da superfície radicular estava recoberta por cimento neoformado.

No presente estudo, a maior extensão de novo cimento esteve associada a uma menor extensão da superfície radicular recoberta por tecidos epitelial/conjuntivo, e a uma maior extensão de regeneração periodontal, ou seja, formação de novo cimento, com fibras colágenas funcionalmente orientadas e inseridas, adjacente ao novo osso. Uma vez alcançada uma maior formação de cimento sobre a superfície radicular, esta passou a ser recoberta por uma menor extensão dos tecidos epitelial/ conjuntivo, o que ficou evidenciado quando a medida deste parâmetro (EEC) foi expressa em porcentagem da distância ocupada entre os “notches” de referência. Embora todos os defeitos dos grupos Células, RTG e Esponja tenham recebido membranas para RTG, apenas os defeitos que receberam as PDLCs apresentaram uma menor extensão de tecido epitelial/conjuntivo (16,7% da superfície radicular) evidenciando a ação destas células no resultado observado.

Além dessa ação indireta sobre as células dos tecidos moles (tecido epitelial/conjuntivo), a maior extensão de novo cimento observada no grupo tratado com as PDLCs também estaria relacionado à maior extensão de regeneração periodontal observada neste grupo. Considerando que o cimento é a superfície onde a inserção das fibras do ligamento periodontal deverá ocorrer e que os componentes da matriz do novo cimento fornecem sinais informativos para a síntese e a inserção de fibras colágenas ao osso e ao cimento recém-formados (Grzesik & Narayanan, 2002), a maior extensão de novo cimento observada no grupo Células favoreceria a regeneração periodontal.

De fato, a análise histométrica revelou uma maior regeneração periodontal nos defeitos tratados com as PDLCs. Resultado semelhante foi encontrado por Iwata *et al.* (2009) que observaram uma completa regeneração periodontal em todos os defeitos infra-ósseos, de três paredes, tratados com células. Entretanto, torna-se importante observar que o tipo de defeito utilizado por Iwata *et al.* (2009) apresenta grande potencial regenerativo diferindo do defeito de

furca grau III utilizado no presente estudo e escolhido justamente por não apresentar possibilidade de fechamento espontâneo e por apresentar um desafio quando tratado com técnicas regenerativas (Giannobile *et al.*, 1998; Rossa *et al.*, 2000). Quando novamente a medida do parâmetro histométrico (RP) foi expressa em porcentagem da distância ocupada entre os sulcos de referência, observou-se que no grupo Células aproximadamente 40% da superfície radicular estava recoberta por novo cemento com fibras inseridas adjacente a novo osso. Este valor é superior ao observado nos grupos RTG e Esponja, mas inferior ao encontrado por Gonçalves *et al.* (2006) quando defeitos semelhantes foram utilizados para avaliar a modulação da regeneração periodontal pelo cemento preservado. No estudo de Gonçalves *et al.* (2006), a regeneração periodontal após RTG, sem a associação com nenhum material de preenchimento, correspondia a 65% da extensão radicular nos defeitos onde o cemento não foi removido. Os autores especularam que a preservação do cemento dental poderia favorecer a regeneração periodontal não apenas através da modulação via cementoblastos e fatores de crescimento presentes em sua matriz, mas também agindo como “barreira” evitando a interação indesejável das proteínas pró-inflamatórias da matriz dentinária com o sítio em cicatrização (Silva *et al.*, 2004; Lara *et al.*, 2003).

Outro efeito positivo do transplante autólogo das células do ligamento periodontal observado no presente estudo foi a maior formação de novo osso. A análise histométrica revelou que os defeitos de furca grau III tratados com as PDLCs apresentaram uma área de novo osso significativamente superior à dos demais grupos. Esse resultado está de acordo com o observado por Murano *et al.* (2006) que utilizando o mesmo tipo de defeito (furca III), obtiveram uma maior formação de osso (84,8%) no grupo tratado com PDLCs quando comparado com o grupo de controle (12,2%). Por outro lado, em defeitos do tipo fenestração e deiscência, Nakahara *et al.* (2004) e Akizuki *et al.* (2005) não observaram diferenças quanto a neoformação óssea nos defeitos tratados com o transplante autólogo de PDLCs. No entanto, os tipos de defeitos utilizados nos estudos anteriores, apresentam uma tábua óssea vestibular delgada, favorecendo a

reabsorção e prejudicando a criação de espaço entre a superfície radicular e o retalho, o que dificulta a regeneração do tecido ósseo.

Esse potencial das células do ligamento periodontal em estimular a neoformação óssea e cementária é compatível com suas propriedades cementoblásticas-osteoblásticas identificadas *in vitro*. Tal como descrito por estudos prévios, as PDLCs isoladas no presente estudo foram capazes de formar nódulos minerais *in vitro* (Arceo *et al.*, 1991; Mukai *et al.*, 1993; Ramakrishnan *et al.*, 1995) além de expressarem os genes para *COL I*, *ALP* e *BSP* (Sommerman *et al.*, 1987; Piche *et al.*, 1989; Arceo *et al.*, 1991; Ramakrishnan *et al.*, 1995; Ivanovski *et al.*, 2001). Dentro do contexto do desenvolvimento da regeneração periodontal, a expressão de *COL I* é associada com a formação de matriz extracelulares e com formação de fibras periodontais; a expressão de *ALP* pode estar envolvida na elaboração da matriz extracelular para a deposição ordenada de minerais, enquanto que a expressão de *BSP* está associada à mineralização de matriz (Lian & Stein, 1992).

Na técnica de engenharia tecidual, um material carreador estável é crucial para o transplante das células. Experiências em que as células são aplicadas sem a associação a um veículo carreador são consideradas pouco confiáveis, uma vez que as células podem ser “lavadas” dos defeitos não agindo no local desejado (Dogan *et al.*, 2002, Lang *et al.*, 1998, van Dijk *et al.*, 1991, Beersten W, 1991). O material carreador (esponja de colágeno) usado no presente estudo é um material biodegradável que está aprovado para aplicações clínicas. Uma análise em microscópio eletrônico de varredura foi realizada, confirmando que o veículo era adequado para o transporte celular, que foi demonstrado pela propagação e aderência das células no interior da estrutura transportadora. Além disso, a esponja de colágeno não causou em nenhum dos animais, qualquer efeito colateral prejudicial significativo, como inflamação ou reação de corpo estranho durante o período de cicatrização, demonstrando-se adequada para a aplicação *in vivo*. No entanto, torna-se importante observar que no grupo onde as esponjas



foram aplicadas sem a associação com as PDLCs (grupo Esponja) foi observado um maior preenchimento ósseo dos defeitos (32,3%) quando comparado ao grupo RTG (21%), onde as mesmas não foram usadas. Mesmo sem diferença estatisticamente significativa este resultado sugere outra ação das esponjas de colágeno além de sua função carreadora. A esponja de colágeno pode ter funcionado como um mantenedor de espaço sob as membranas, impedindo que estas se colabassem e facilitando o preenchimento da área do defeito por células circunvizinhas (Shimoji *et al.*, 2009).

Embora resultados favoráveis quanto à utilização das células do ligamento periodontal no tratamento de defeitos de furca III tenham sido observados no presente estudo, é importante ressaltar a necessidade da realização de estudos futuros para esclarecer o mecanismo de ação das PDLCs no processo de regeneração periodontal e as concentrações ideais de células no material carreador. A aplicação da engenharia tecidual na regeneração periodontal, embora promissora, não poderá ser aplicada na clínica diária em um curto espaço de tempo. Será necessário um esforço multidisciplinar, envolvendo desde biólogos a engenheiros químicos, além dos periodontistas, antes de se propor como rotina ambulatorial realizar a cultura e o armazenamento de células presentes no ligamento periodontal para posterior reimplante em um defeito periodontal.

## 7. CONCLUSÃO

Dentro dos limites desse estudo podemos concluir que transplante autógeno de células do ligamento periodontal (PDLs), associado à RTG, favoreceu a regeneração periodontal (formação de novo osso e novo cemento com fibras inseridas) em defeitos de furca grau III criadas cirurgicamente em cães.

## REFERÊNCIAS <sup>1</sup>

1. Akizuki Oda S, Komaki M, Tsuchioka H, Kawakatsu N, Kikuchi A, Yamato M, Okano T, Ishikawa I. Application of periodontal ligament cell sheet for periodontal regeneration: a pilot study in beagle dogs. *J Periodontal Res* 2005;40(3):245-51.
2. American Academy of Periodontology. Glossary of periodontal terms. *J. Periodont.*, Chicago, 1992. Special issue.
3. Arceo N, Sauk JJ, Moehring J, Foster RA, Somerman MJ. Human periodontal cells initiate mineral-like nodules in vitro. *J Periodontol* 1991;62(8):499-503.
4. Aukhil I, Simpson DM, Suggs C, Pettersson E. In vivo differentiation of progenitor cells of the periodontal ligament. An experimental study using physical barriers. *J Clin Periodontol.* 1986;13(9):862-8.
5. Bartold PM, McCulloch CA, Narayanan AS, Pitaru S. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontol* 2000 2000; 24:253-269.
6. Bartold PM, Shi S, Gronthos S. Stem cells and periodontal regeneration. *Periodontol* 2000 2006; 164-172.
7. Buser D, Warrer K, Karring T. Formation of a periodontal ligament around titanium implants. *J Periodontol* 1990; 61(9):597-601.
8. Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Vasilic N, Madzarevic M, Kenney EB. Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guide tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodontol.* 2002; 37: 300-306.

---

<sup>1</sup> De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

9. Carranza FA Jr Reconstructive osseous surgery. In: Carranza FA Jr, Newman MG. Eds Glickman's Clinical Periodontology. Philadelphia: W.B. Saunders; 1996: 269-278.
10. Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr, Caffesse RG, Sallum AW. Enamel matrix derivative and bone healing after guided bone regeneration in dehiscence-type defects around implants. A histometric study in dogs. JPeriodontol.2002;73(7):789-96.
11. Caton J, Nyman S, Zander H. Histometric evaluation of periodontal surgery. II. Connective tissue attachment levels after four regenerative procedures. J Clin Periodontol 1980; 7: 224-231.
12. Caton JG, Greenstein G. Factors related to periodontal regeneration. Periodontol 2000 1993; 1:9-15.
13. Cortellini P, Pini Prato G, Baldi C, Clauser C. Guided tissue regeneration with different materials. Int J Periodontics Restorative Dent 1990;10:136-151.
14. Cortellini P, Clauser C, Pini Prato G. Histologic assessment of new attachment following the treatment of human buccal recession by means of guided tissue regeneration procedures. J Periodontol 1993; 64: 387-391.
15. Cortellini P & Tonetti M. Focus on intrabony defects: guided tissue regeneration. Periodontol 2000. 2000; 22: 104-132.
16. Dogan A, Ozdemir A, Kubar A, Oygur T. Assessment of periodontal healing by seeding of fibroblast-like cells derived from regenerated periodontal ligament in artificial furcation defects in a dog: a pilot study. Tissue Eng. 2002;8(2):273-82.
17. Egelberg J. Regeneration and repair of periodontal tissues. J Periodontol Res 1987; 22: 233-242.
18. Flores MG, Hasegawa M, Yamato M, Takagi R, Okano T, Ishikawa I. Cementum-periodontal ligament complex regeneration using the cell sheet technique. J Periodontal Res. 2008 ;43(3):364-71.

19. Giannobile WV, Ryan S, Shih MS, Su DL, Kaplan PL, Chan TC. Recombinant human osteogenic protein-1 (OP-1) stimulates periodontal wound healing in class III furcation defects. *J Periodontol* 1998;69(2):129-37.
20. Gonçalves PF, Gurgel BC, Pimentel SP, Sallum EA, Sallum AW, Casati MZ, Nociti FH. Root cementum modulates periodontal regeneration in Class III furcation defects treated by the guided tissue regeneration technique: a histometric study in dogs. *J Periodontol*. 2006;77(6):976-82.
21. Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T, Wennstrom J. New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. *J Clin Periodontol* 1986 ;13(6):604-16.
22. Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol*. 1984; 11(8):494-503.
23. Grzesik WJ, Narayanan AS. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(6):474-84.
24. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(25):13625-30.
25. Han X, Amar S. IGF-1 signaling enhances cell survival in periodontal ligament fibroblasts vs. gingival fibroblasts. *J Dent Res* 2003; 82:454-459.
26. Hasegawa M, Yamato M, Kikuchi A, Okano T, Ishikawa I. Human periodontal ligament cell sheets can regenerate periodontal ligament tissue in an athymic rat model. *Tissue Eng* 2005; 3(4): 469-478.
27. Ivanovski S, Li H, Haase HR, Bartold PM. Expression of bone associated macromolecules by gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res*. 2001;36(3):131-41.

28. Iwata T, Yamato M, Tsuchioka H, Takagi R, Mukobata S, Washio K, Okano T, Ishikawa I. Periodontal regeneration with multi-layered periodontal ligament-derived cell sheets in a canine model. *Biomaterials*. 2009;30(14):2716-23.
29. Karring T, Nyman S, Lindhe J. Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. *J Clin Periodontol*. 1980;7(2):96-105.
30. Karring T, Lindhe J, Cortellini P. Regenerative periodontal therapy. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP, eds. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. Copenhagen: Munksgaard; 1997: 597-646.
31. Lang H, Schuler N, Nolden R. Attachment formation following replantation of cultured cells into periodontal defects--a study in minipigs. *J Dent Res*. 1998;77(2):393-405.
32. Lara VS, Figueiredo F, da Silva TA, Cunha FQ. Dentin-induced *in vivo* inflammatory response and *in vitro* activation of murine macrophages. *J Dent Res* 2003;82:460-5.
33. Lekic P, Sodek J, McCulloch CA. Relationship of cellular proliferation to expression of osteopontin and bone sialoprotein in regenerating rat periodontium. *Cell Tissue Res*. 1996;285(3):491-500.
34. Lian JB, Stein GS. Concepts of Osteoblast Growth and Differentiation: Basis for Modulation of Bone Cell Development and Tissue Formation. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 3(3):269-305 (1992).
35. Lindhe J, Ericsson I. The effect of elimination of jiggling forces on periodontally exposed teeth in the dog. *J Periodontol* 1982; 53(9): 562-7.
36. Listgarten MA, Rosenberg MM. Histological study of repair following new attachment procedures in human periodontal lesions. *J Periodontol*. 1979; 50: 333-344.
37. Lynch SE. Methods for evaluation of regenerative procedures. *J Periodontol* 1992; 63:1085-1092.

38. MacNeil RL, Somerman MJ. Development and regeneration of the periodontium: parallels and contrasts. *Periodontol* 2000. 1999;19:8-20
39. MacNeil RL, Berry J, D'Errico J, Strayhorn C, Piotrowski B, Somerman MJ. Role of two mineral-associated adhesion molecules, osteopontin and bone sialoprotein, during cementogenesis. *Connect Tissue Res*. 1995;33(1-3):1-7.
40. Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol* 1976; 47: 256-260.
41. Mizuno M, Fujisawa R, Kuboki Y. Type I collagen-induced osteoblastic differentiation of bone-marrow cells mediated by collagen- $\alpha$ 2 $\beta$ 1 integrin interaction. *J Cell Physiol*. 2000;184(2):207-13.
42. Miyamoto T, Mizuno M, Tamura M, Kawanami M. Osteoblast-related gene expression of rat bone marrow cells induced by three dimensional cell culture in type I collagen gel. *Jpn J Oral Biol*. 2002; 44:530-40.
43. Mukai M, Yoshimine Y, Akamine A, Maeda K. Bone-like nodules formed in vitro by rat periodontal ligament cells. *Cell Tissue Res*. 1993;271(3):453-60.
44. Murano Y, Ota M, Katayama A, Sugito H, Shibukawa Y, Yamada S. Periodontal regeneration following transplantation of proliferating tissue derived from periodontal ligament into class III furcation defects in dogs. *Biomedical Research* 2006; 27(3): 139-147.
45. Nakahara T, Nakamura T, Kobayashi E, Kuremoto K, Matsuno T, Tabata Y, Eto K, Shimizu Y. In situ tissue engineering of periodontal tissues by seeding with periodontal ligament-derived cells. *Tissue Eng*. 2004;10(3-4):537-44.
46. Nyman S, Karring T, Lindhe J. Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. *J Clin Periodontol* 1980; 7: 394.

47. Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J Clin Periodontol.* 1982;9(3):257-65.
48. Nyman S, Houston F, Sarhed G, Lindhe J. Healing following reimplantation of teeth subjected to root planning and citric acid treatment. *J Clin Periodontol.* 1985; 12: 294.
49. Park JB, Matsuura M, Han KY, Norderyd O, Lin WL, Genco RJ, Cho MI. Periodontal regeneration in class III furcation defects of beagle dogs using guided tissue regenerative therapy with platelet-derived growth factor. *J Periodontol.* 1995 Jun;66(6):462-77.
50. Piche JE, Carnes DL Jr, Graves DT. Initial characterization of cells derived from human periodontia. *J Dent Res.* 1989;68(5):761-7.
51. Pitaru S, Pritzki A, Bar-Kana I, Grosskopf A, Savion N, Narayanan AS. Bone morphogenetic protein 2 induces the expression of cementum attachment protein in human periodontal ligament clones. *Connect Tissue Res* 2002; 43:257-264.
52. Ramakrishnan PR, Lin WL, Sodek J, Cho MI. Synthesis of noncollagenous extracellular matrix proteins during development of mineralized nodules by rat periodontal ligament cells in vitro. *Calcif Tissue Int.* 1995;57(1):52-9.
53. Robey PG, Termine JD. Human bone cells in vitro. *Calcif Tissue Int.* 1985;37(5):453-60.
54. Rossa C Jr, Marcantonio E Jr, Cirelli JA, Marcantonio RA, Spolidorio LC, Fogo JC. Regeneration of Class III furcation defects with basic fibroblast growth factor (b-FGF) associated with GTR. A descriptive and histometric study in dogs. *J Periodontol* 2000;71(5):775-84.
55. Rosen PS, Reynolds MA, Bowers GM. The treatment of intrabony defects with bone grafts. *Periodontol 2000.* 2000; 22: 88-103.





56. Rosling B, Nyman S, Lindhe J. The effect of systematic plaque control on bone regeneration in infrabony pockets. J Clin Periodontol 1976; 3(1):38-53.
57. Sallum EA, Pimentel SP, Saldanha JB, Nogueira-Filho GR, Casati MZ, Sallum AW. Enamel matrix derivative and guided tissue regeneration in the treatment of dehiscence-type defects: a histomorphometric study in dogs. J Periodontol. 2004;75(10):1357-63.
58. Sander L, Karring T. Healing of periodontal lesions in monkeys following the guided tissue regeneration procedure. A histological study. J Clin Periodontol. 1995 Apr;22(4):332-7
59. Sculean A, Barbé G, Chiantella GC, Arweiler NB, Berakdar M, Becx M. Clinical evaluation of enamel matrix protein derivate combined with a bioactive glass for the treatment of intrabony periodontal defects in humans. J Periodontol. 2002; 73: 401-408.
60. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. Lancet, 364: 149-155, 2004.
61. Shimono M, Ishikawa T, Ishikawa H, Matsuzaki H, Hashimoto S, Muramatsu T, Shima K, Matsuzaka K, Inoue T. Regulatory mechanisms of periodontal regeneration. Microsc Res Tech. 2003;60(5):491-502.
62. Shimoji S, Miyaji H, Sugaya T, Tsuji H, Hongo T, Nakatsuka M, Uz Zaman K, Kawanami M. Bone perforation and placement of collagen sponge facilitate bone augmentation. J Periodontol. 2009 Mar;80(3):505-11.
63. Silva TA, Lara VS, Rosa AL, Cunha FQ. Cytokine and chemokine response of bone cells after dentin challenge *in vitro*. Oral Dis 2004; 10:258-64.
64. Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. J Dent Res. 1988;67(1):66-70.

65. Tvaluc RT, Harts LS, Dicker DT, El-Diery WS. Effects of low confluency, serum starvation and hypoxia on the side population of cancer cell lines. *Cell Cycle* 2007; 15:2554-62.
66. Van Dijk LJ, Schakenraad JM, van der Voort HM, Herkstroter FM, Busscher HJ. Cell-seeding of periodontal ligament fibroblasts. A novel technique to create new attachment. A pilot study. *J Clin Periodontol.* 1991;18(3):196-9.
67. Venezia E, Goldstein M, Boyan BD, Schwartz Z. The use of enamel matrix derivative in the treatment of periodontal defects: a literature review and meta-analysis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004 Nov 1;15(6):382-402.
68. Warrer K, Karring T, Gottfredsen K. Periodontal ligament formation around different types of dental titanium implants. I. The self-tapping screw type implant system. *J Periodontol.* 1993 ;64(1):29-34.
69. Wikesjö UM, Kean CJ, Zimmerman GJ. Periodontal repair in dogs: supraalveolar defect models for evaluation of safety and efficacy of periodontal reconstructive therapy. *J Periodontol.* 1994;65(12):1151-7.

## ANEXO

### Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Unicamp.

 UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas Instituto de Biologia	 CEEAB-IB-UNICAMP
--	--	---

---

**Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEAB-IB-UNICAMP**



**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 1082-1, sobre "AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA DO USO DE CÉLULAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL NA REGENERAÇÃO PERIODONTAL EM CÃES", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Enilson Antonio Sallum / Fabricia Ferreira Suaid, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAB)-IB-UNICAMP em 30 de agosto de 2006.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº 1082-1, entitled "THE USE OF LIGAMENT CELL IN THE PERIODONTAL REGENERATION. A HISTOLOGICAL EVALUATION IN DOGS", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on August 30, 2006.

Campinas, 30 de agosto de 2006.

 _____ Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo Presidente	 _____ Fátima Alonso Secretária Executiva
--	--

---

<small>CEEAB-IB - Unicamp Caixa Postal 6105 13083-970 Campinas, SP - Brasil</small>	<small>Telefone: (19) 3788-6359 Telefax: (19) 3788-6356 E-mail: <a href="mailto:ceea@cemib.unicamp.br">ceea@cemib.unicamp.br</a> <a href="http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm">http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm</a></small>
---	--